

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
DIREKTORIN: PROF. DR. MED. M. MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Veränderungen der Konzentration von Chemokinen in  
peritonealer Flüssigkeit und Serum bei Patienten mit  
Leberzirrhose und Peritonitis

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sonja Schuldes

2015



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
DIREKTORIN: PROF. DR. MED. M. MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Veränderungen der Konzentration von Chemokinen in  
peritonealer Flüssigkeit und Serum bei Patienten mit  
Leberzirrhose und Peritonitis

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sonja Schuldes

2015

**Dekan:** **Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

**1. Berichterstatter:** **Prof. Dr. Reiner Wiest**

**2. Berichterstatter:** **Prof. Dr. Martin Loss**

**Tag der mündlichen Prüfungen:** **16. März 2016 in Regensburg und  
22. März 2016 in Bern**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Hintergrund: Vorstellung der untersuchten Chemokine und deren systemischer Bedeutung .....	2
2.1. Grundlagen über Chemokine .....	3
2.1.1. Eotaxin (CCL11) .....	4
2.1.2. IL-8 (Interleukin 8, CXCL8) .....	5
2.1.3. MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1, CCL2) .....	6
2.1.4. MIP-1 $\alpha$ (Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , CCL3) .....	7
2.1.5. MIP-1 $\beta$ (Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ , CCL4) .....	8
2.1.6. RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor, CCL5).....	9
2.2. Übersicht über weitere Zytokine: Interferone (IFN- $\gamma$ ), Interleukine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A) und Tumornekrosefaktoren (TNF- $\alpha$ )	10
3. Material und Methoden .....	12
3.1. Akquirierung des Patientenkollektivs .....	12
3.2. Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs .....	12
Tab. 1: Charakterisierung der Studienkohorte .....	13
3.2.1. Bestimmung der Basisparameter.....	13
3.2.2. Unterscheidung der Patienten hinsichtlich Vorhandensein, Schweregrad und Genese einer Leberzirrhose .....	13
3.2.2.1. Diagnostik der Leberzirrhose und Erfassung der Folgeerscheinungen.....	13
3.2.2.2. Unterscheidung des Schweregrads der Leberzirrhose.....	15
3.2.2.3. Unterscheidung der Ätiologie der Leberzirrhose .....	17
3.2.3. Charakterisierung des Aszites .....	18

3.2.3.1. Differenzierung des Aszites in portale, kardiale oder andere Genese.....	19
3.2.3.2. Maligner Aszites und Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit und ohne hepatozellulärem Karzinom .....	19
3.2.4. Einteilung der Patienten hinsichtlich Vorhandensein und Genese einer Peritonitis.....	20
3.3. Aufklärung der Patienten .....	22
3.4. Asservierung der Proben .....	22
3.5. Chemokinbestimmung .....	23
3.5.1 Testprinzip der Multiplex-Luminex Technik.....	24
3.5.2. Benötigte Materialien und Probenvorbereitungen.....	26
3.5.3. Durchführung des Immunoassays .....	27
3.5.4. Auswertung der mittels Multiplex-Luminex Technik bestimmten Chemokine .....	27
3.5.5. Charakteristika des Assays .....	28
3.6. Statistik .....	28
4. Ergebnisse .....	28
4.1. Charakterisierung der Studienkohorte .....	29
4.1.1. Vorhandensein oder Abwesenheit einer Leberzirrhose, Child-Pugh-Score und MELD-Score.....	30
4.1.2. Ätiologie der Leberzirrhose.....	30
4.1.3. Ätiologie des Aszites.....	30
4.1.4. Vorhandensein oder Abwesenheit eines hepatozellulären Karzinoms .....	31
4.1.5. Vorhandensein oder Abwesenheit einer Peritonitis .....	31
4.2. Chemokine.....	31
4.2.1. Detektion der Chemokine .....	31

4.2.2. Signifikante Konzentrationserhöhungen der Chemokine in den Subgruppenanalysen.....	32
4.2.3. Korrelation der Chemokine in Aszites und Serum .....	34
4.2.4. Detektion weiterer Zytokine in Aszites und Serum und deren Korrelation zu MIP-1 $\beta$ .....	41
4.3. Übersicht über die Kernaussagen des Ergebnisteils.....	51
5. Diskussion.....	51
6. Zusammenfassung.....	56
I. Abkürzungsverzeichnis .....	VI
II. Abbildungsverzeichnis .....	VIII
III. Tabellenverzeichnis .....	XI
IV. Literaturverzeichnis.....	XII
V. Danksagung.....	

## 1. Einleitung

Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist der „Prototyp“ einer infektiösen Erkrankung bei Leberzirrhose (1). Vielfältige Defekte in der Immunabwehr wurden bei Patienten mit Leberzirrhose beschrieben, die eine erhöhte Anfälligkeit dieser Patientengruppe für eine bakterielle Infektion erklären können: eine beeinträchtigte und verspätete Hypersensitivitätsreaktion (2), verminderte humorale Funktion sowie gestörte Komplementproduktion durch die erkrankte Leber (3). Außerdem weisen Patienten mit Leberzirrhose eine Zunahme von aeroben gram-negativen Bakterien in der Jejunalflora, Störungen in der intestinalen Barriere, eine gesteigerte bakterielle Translokation zu mesenterialen Lymphknoten und gehäufte Bakteriämien auf (4). Als Konsequenz dieser Eigenschaften konnte eine erhöhte Prävalenz von Endotoxämien bei Zirrhosepatienten gezeigt werden (5). Die SBP ist als bakterielle Entzündung der Peritonealhöhle ohne Hinweis auf eine anderweitige intraabdominelle Ursache der Infektion definiert (6). In großen Kollektiven von stationären Patienten mit Leberzirrhose wird eine SBP bei etwa 25% aller Patienten nachgewiesen. Mit einem Anteil von etwa 66% tritt sie häufiger auf als z.B. eine Pneumonie oder ein Harnwegsinfekt (7)(8). Die verantwortlichen Bakterien sind meist aerobe oder microaerophile enterale Organismen. Die Mortalität der SBP bei einer ersten Episode beträgt zwischen 10 und 50%. Die 1-Jahresmortalität nach Auftreten einer ersten SBP liegt zwischen 31 und 93% (6). Eine Infektion eines Patienten mit Zirrhose steigert das Mortalitätsrisiko auf das Vierfache (7). Patienten mit einer diagnostizierten SBP sollten umgehend eine kalkulierte antibiotische Therapie bekommen, da gezeigt werden konnte, dass die Mortalität durch eine verspätete Diagnose und Behandlung steigt (9)(10).

Die zuvor genannten Daten zeigen, welche Wichtigkeit der schnellen Diagnose und Behandlung einer SBP zukommt. Allerdings erschweren einige Besonderheiten von Zirrhosepatienten die Diagnosestellung einer bakteriellen Infektion. Eine SBP kann symptomarm ablaufen und bleibt selbst bei Patienten mit Symptomen aufgrund der niedrigen bakteriellen Dichte im Aszites in bis zu 50% der Fälle kulturnegativ. Es wurde beschrieben, dass selbst das Systemic



Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bis zu 30% der nicht infizierten Patienten fälschlicherweise zugeschrieben und nur bei 57-70% der Betroffenen diagnostiziert wurde (11). Eine Leukozytose kann durch eine Splenomegalie maskiert sein (14)(12). Auf der anderen Seite kann eine Enzephalopathie oder Verschlechterung der Leberfunktion der einzige Ausdruck einer maskierten Infektion sein. Insbesondere bei Patienten mit Enzephalopathie ist die Differenzierung zwischen bakteriellen Infektionen schwierig. So ist es beispielsweise schwierig eine Pneumonie zu diagnostizieren oder auszuschließen, da Dyspnoe und Atelektasen häufig bei Patienten mit Aszites und Malnutrition zu finden sind; eine Leukozyturie korreliert nicht immer mit einem Harnwegsinfekt und die Diagnose einer spontanen Bakteriämie kann erst gestellt werden, sobald die Ergebnisse einer Blutkultur eintreffen.

Dies unterstreicht die Wichtigkeit, Laborparameter zu untersuchen, welche die Diagnosestellung einer SBP erleichtern können. Die peritoneale neutrophile Infiltration bei einer SBP macht es wahrscheinlich, dass eine hohe Konzentration von Chemokinen mit der Möglichkeit, neutrophile Granulozyten („polymorphonuclear neutrophils“ PMN) anzuziehen, zu finden ist. Das Ziel dieser Studie war es daher, Serum- und Asziteskonzentrationen der Chemokine Eotaxin, Interleukin 8 (IL-8), Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) und Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor (RANTES) bei Zirrhosepatienten mit Aszites als mögliche Marker einer SBP zu untersuchen.

## **2. Hintergrund: Vorstellung der untersuchten Chemokine und deren systemischer Bedeutung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Chemokine Eotaxin, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES in peritonealer Flüssigkeit sowie im Serum nachgewiesen und mittels Multiplex-Luminex Technik quantifiziert. Die Bedeutung dieser Chemokine und deren systemische sowie pathophysiologische Relevanz soll im Folgenden dargestellt werden.

## 2.1. Grundlagen über Chemokine

Die Bezeichnung Chemokine leitet sich von chemotaktischen Zytokinen ab und benennt eine Gruppe von Signalproteinen, welche für die Chemotaxis (Migration) von Zielzellen zu Entzündungen, aber auch für die Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen verantwortlich sind (13).

Chemokine bestehen aus ca. 75 bis 125 Aminosäuren und weisen eine Molmasse zwischen 8 und 14 kDa auf. Die Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine, im Gegensatz zu diesen weisen Chemokine jedoch eine streng konservierte Tertiärstruktur auf: der Amino-Terminus ist ungeordnet, der Hauptkörper wird durch ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt gebildet und der Carboxy-Terminus endet mit einer  $\alpha$ -Helix (14). Anhand von Anzahl und Position der Cysteinreste („C“), welche Disulfidbrücken ausbilden können, und optionaler Anwesenheit von Aminosäuren („X“) am Amino-Terminus lassen sich die Chemokine in vier Untergruppen aufteilen ((15), siehe Abb.1).

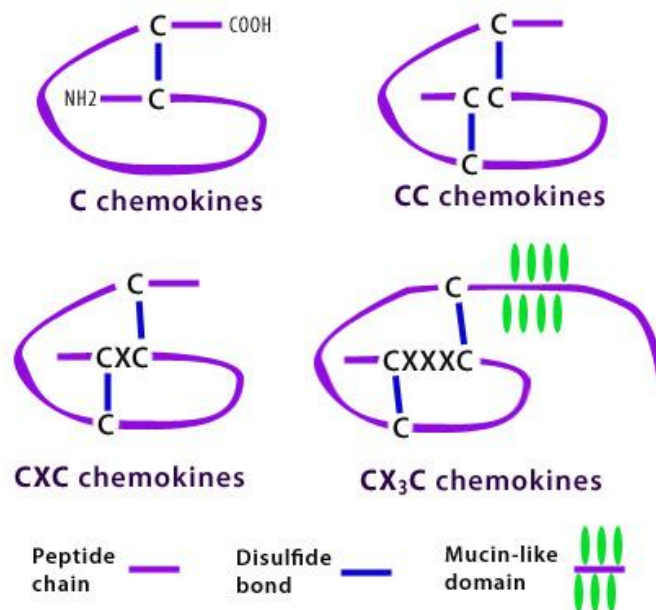


Abb. 1: Strukturen und Klassifikation der Chemokine. Es werden anhand des strukturellen Aufbaus die C-, CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Familien unterschieden.

Die größte Untergruppe, die CXC-Familie, wird von der zweitgrößten Untergruppe, der CC-Familie, durch die An- bzw. Abwesenheit einer zusätzlichen Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinresten unterschieden (16).

Beim Menschen bilden ca. 50 Chemokine und 20 G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren ein komplexes Signalnetzwerk (17). Chemokinrezeptoren besitzen sieben Membranhelices, welche über ein G-Protein die Signaltransduktion durchführen (18). Chemokine arbeiten mithilfe von Konzentrationsgradienten. Es lassen sich inflammatorische (oder induzierbare) und homöostatische (oder konstitutive) Chemokine unterscheiden. Die meisten Chemokine wirken inflammatorisch: ihre Produktion wird durch Verletzung, Infektion oder Entzündung angeregt und ihre Freisetzung lockt Immunzellen an. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, allergischer Rhinitis, Multiple Sklerose u.a. findet sich eine erhöhte Chemokinexpression (18). Die Untergruppe der CXC-Familie wird weiter anhand der An- oder Abwesenheit einer Glutamin-Leukin-Arginin-Aminosäuresequenz, des sog. ELR-Motivs, nahe des aktiven Terminus unterschieden: diejenigen wie z.B. IL-8, welche diese Sequenz besitzen, sind chemotaktisch für Neutrophile und induzieren deren Migration, während die Gruppe der ELR-negativen chemotaktisch auf Lymphozyten wirkt (19). Die Subgruppe der CC-Familie übt nur Chemotaxis auf mononukleäre Zellen aus (20). Die genaue molekulare Struktur ist hierbei noch Gegenstand aktueller Forschungen.

### **2.1.1. Eotaxin (CCL11)**

Eotaxin (CCL11) gehört zur Familie der CC-Chemokine. Es wurde lange Zeit angenommen, dass es selektiv Eosinophile anzieht, indem es CCR3-Rezeptoren aktiviert (21). Neuere Studien legen jedoch nahe, dass Eotaxin auch zusätzliche Effekte auf andere inflammatorische Leukozyten wie Neutrophile, Basophile und T-Lymphozyten aber auch auf Endothel haben könnte (22)(23). Die Effekte von Eotaxin werden durch seine Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (Chemokinrezeptor) vermittelt, Eotaxin bindet an CCR2, CCR3 und CCR5 (24)(25). Es wird mit verschiedenen Störungen wie allergischem Asthma, eosinophilen-assoziierten gastrointestinalen Erkrankungen, pulmonaler Fibrose, Atherosklerose, Schizophrenie aber auch Cannabis-Konsum in Verbindung gebracht (23)(26)(27)(28)(29). Erhöhte Serumkonzentrationen von Eotaxin konnten folglich bei Patienten mit Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und koronarer Herzkrankheit

gefunden werden (30)(31). Es konnte von Tacke et al. gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von Eotaxin bei Leberzirrhose erhöht ist. Sie korreliert direkt mit dem Grad der Nekroinflammation und Fibrose in der histologischen Untersuchung der Leber und steigt entsprechend zum CHILD- und MELD-Score an. Sie ist somit ein ungünstiger Prognosefaktor für die Überlebenszeit (32). In einem Mausmodell, bei dem eine Leberverletzung durch ConA-induzierte T-Zellen vermittelt wurde, resultierte eine Rekrutierung von Eosinophilen und Neutrophilen zu dem verletzten Lebergewebe durch die Expression von Eotaxin durch Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen, begleitet von einer erhöhten Serumkonzentration von Eotaxin; im Gegensatz hierzu schwächte eine Blockade von Eotaxin die ConA-induzierte Hepatitis und Leukozyteninfiltration (33). Die Genexpression von Eotaxin wird erheblich in älteren Zellen im Vergleich zu proliferativen hepatischen Sternzellen hochreguliert (34). Neben einer charakteristischen eosinophilen Infiltration konnte eine erhöhte Expression von Eotaxin in Lebergewebe von Patienten mit drogeninduzierter Lebererkrankung gefunden werden (35).

### **2.1.2. IL-8 (Interleukin 8, CXCL8)**

Interleukin 8 (IL-8) gehört zur Familie der CXC-Chemokine (CXCL8) und ist ELR-positiv. Es ist ein starkes, Neutrophile aktivierendes Chemokin, welches von Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, Neutrophilen und NK-Zellen, aber auch von anderen Zelltypen wie epithelialen Zellen, endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen der Luftwege und weißem Fettgewebe mit chemotaktischem Potential produziert wird (36)(37)(38)(39). Die Produktion von IL-8 wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$  und Visfatin stimuliert (40). Es gibt mehrere Rezeptoren an der Oberflächenmembran, welche IL-8 binden können; die am meisten erforschten sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. IL-8 soll bei der Transmigration von Leukozyten und Makrophagen zu infiziertem Gewebe sowie ihrer Stimulation zur Degranulation involviert sein (41), aber auch Phagozytose induzieren. IL-8 lockt polymorphonukleäre Leukozyten an; diese sind die vorherrschenden inflammatorischen Zellen, welche die Leber von Patienten mit alkoholischer Leberkrankheit infiltrieren (42). Es konnte gezeigt werden, dass

erhöhte Serumkonzentrationen von IL-8 eng mit den klinischen, histologischen und laborchemischen Indikatoren der Schwere einer alkoholischen Lebererkrankung korrelieren (43)(44). Bei Patienten mit ethyltoxischer Hepatitis korreliert die Expression von IL-8 mit der Schwere der portalen Hypertension und der Überlebenszeit der Patienten (45). In zwei unabhängigen Studien war die SBP mit erhöhten Serum- und Asziteskonzentrationen von IL-8 assoziiert (46)(47), Giron et al. zeigte zusätzlich, dass die Konzentration von IL-8 signifikant mit der Anzahl der Neutrophilen (PMN) im Aszites stieg (47). IL-8 wird als proinflammatorischer Mediator mit anderen entzündlichen Erkrankungen wie Gingivitis und Psoriasis, aber auch oxidativem Stress, Fettleibigkeit und Schizophrenie in Verbindung gebracht (47)(49)(50)(51)(52). Es wurden erhöhte Konzentrationen von IL-8 im Aszites bei ovariellen Tumoren gefunden, diese waren im Vergleich zur Serumkonzentration auf das 40- bis 500-fache erhöht (53). IL-8 soll in vivo das Wachstum von ovariellen Tumoren fördern (54).

### **2.1.3. MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1, CCL2)**

Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gehört zur Familie der CC-Chemokine (CCL2). Die Expression von MCP-1 kann durch viele Zelltypen wie z.B. inflammatorische Zellen, Hepatozyten und hepatische Sternzellen induziert werden. CCR2 und CCR4 binden an MCP-1 (55). CCR2 wird von Monozyten, T-Lymphozyten und Basophilen exprimiert (56). Interaktionen zwischen MCP-1 und CCR2 werden für IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -induzierte inflammatorische Antworten sowie antivirale Abwehr in der Leber benötigt (57). MCP-1 reguliert Adhäsionsmoleküle und die proinflammatorische Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-6 (58) und weist eine chemotaktische Aktivität für Monozyten, Basophile und T-Lymphozyten auf (59). Es wurde gezeigt, dass die Expression von MCP-1 mit vielen Krankheiten wie entzündlichen Antworten, Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Atherosklerose, Glomerulonephritis und malignen Tumoren assoziiert ist (60)(61). Auch spielt MCP-1 eine Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen mit neuronaler Degeneration im ZNS: die Expression von MCP-1 durch Gliazellen ist bei Epilepsie, cerebraler Ischämie, Morbus Alzheimer, autoimmuner Enzephalomyelitis und traumatischen Hirnverletzungen gesteigert

(62)(63)(64)(65)(66). Die Möglichkeit von MCP-1, Oligomere zu bilden, ist wichtig für die in vivo Rekrutierung von Zellen in die Peritonealhöhle bei Mäusen (67). Die Serumkonzentration von MCP-1 ist bei Sepsis erhöht (68) und bei bakteriellen Entzündungen signifikant höher im Vergleich zu viralen Infekten (69). In zwei unabhängigen Studien war die SBP mit einer erhöhten Asziteskonzentration von MCP-1 assoziiert (46)(47). In einer weiteren Studie von Kim et al. wurden signifikant erhöhte Serum- und Asziteskonzentrationen von MCP-1 bei Zirrhosepatienten mit SBP gefunden, welche im Verlauf der Behandlung des Patienten fielen; niedrige Konzentrationen am 7. Behandlungstag korrelierten signifikant mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (70). Bei ethyltoxischer Hepatitis konnte eine höhere Serumkonzentration von MCP-1 im Vergleich zu Patienten mit Zirrhose oder dem gesunden Kollektiv detektiert werden (20). Bei Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose ist der -2518 MCP-1 Genotyp AA ein Risikofaktor für das Entwickeln einer SBP (71). Bei Ratten konnte durch Unterdrückung einer Macrophageninfiltration durch Blocken von MCP-1 die Aktivierung von hepatischen Sternzellen und Leberfibrose unterbunden werden (72). Es konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von MCP-1 bei Patienten mit Leberzirrhose erhöht ist und mit dem histologischen Grad der Leberentzündung (73) und Fibrose (32) korreliert. Die hepatische Expression von MCP-1 korreliert mit der Intensität der Infiltration von Monozyten und Lymphozyten bei einer alkoholischen Lebererkrankung (74).

### **2.1.4. MIP-1 $\alpha$ (Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , CCL3)**

Bei Menschen gibt es zwei Hauptformen des Macrophage inflammatory proteins (MIP): MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ . MIP-1 $\alpha$  gehört zur Familie der CC-Chemokine (CCL3). MIP-1 $\alpha$  wird von vielen Zellen, insb. Makrophagen, aber auch dendritischen Zellen und Lymphozyten produziert (75) und wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten (20) und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile), welche zu einer akuten neutrophilen Entzündung führen können. Es kann auch die Synthese und Freisetzung anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Fibroblasten und Makrophagen induzieren. Die Synthese von MIP-1 $\alpha$  wird

durch bakterielle Endotoxine stimuliert (76). MIP-1 $\alpha$  ist somit wichtig für Chemotaxis und Immunantworten bei Infektion und Entzündung (76), kann aber auch die Homöostase fördern (75). MIP-1 kann mehrere Chemokinrezeptoren (CCR1, CCR3 und CCR5) aktivieren (78), welche diverse zelluläre Antworten initiieren, die sowohl akute als auch chronische Entzündungen regulieren. Folglich ist die Deregulation von MIP-1 $\alpha$  mit einer erhöhten Suszeptibilität von Infektionen und Erkrankungen vergesellschaftet (79). Biophysikalische Analysen und mathematische Modelle haben gezeigt, dass MIP-1 eine reversible polydisperse Verteilung von stäbchenförmigen Polymeren in Lösung zeigt. Die Polymerisation verbirgt die rezeptorbindende Stelle des Proteins, weshalb depolymerisierte Mutationen von MIP-1 die Haftung von Monozyten auf aktiviertem Endothel fördern (76). Die Sekretion von MIP-1 $\alpha$  durch Monozyten ist bei schwerer ethyltoxischer Hepatitis erhöht (80). Die hepatische Expression von MIP-1 $\alpha$  korreliert mit der Intensität der Infiltration von Monozyten und Lymphozyten bei einer alkoholischen Lebererkrankung (74).

### **2.1.5. MIP-1 $\beta$ (Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ , CCL4)**

Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) gehört zur Familie der CC-Chemokine (CCL4), welche für ihre chemotaktischen und proinflammatorischen Effekte bekannt ist. MIP-1 $\beta$  wird von vielen Zellen, insbesondere Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten produziert (75). Die Synthese von MIP-1 $\beta$  wird durch bakterielle Endotoxine stimuliert (76). Es kann die Synthese und Freisetzung anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Fibroblasten und Makrophagen induzieren. MIP-1 $\beta$  ist für die Aktivierung von PMN zuständig und ist somit an der Chemotaxis und akuten neutrophilen Entzündung beteiligt (76), kann aber auch die Homöostase fördern (75). MIP-1 kann mehrere Chemokinrezeptoren (CCR1 und CCR5) aktivieren, welche diverse zelluläre Antworten initiieren, die sowohl akute als auch chronische Entzündungen regulieren. Biophysikalische Analysen und mathematische Modelle haben gezeigt, dass MIP-1 $\beta$  eine reversible polydisperse Verteilung von stäbchenförmigen Polymeren in Lösung zeigt. Die Polymerisation verbirgt die rezeptorbindende Stelle des Proteins, weshalb depolymerisierte Mutationen von MIP-1 $\beta$  die Haftung von Monozyten auf aktiviertem Endothel fördern (76).

Die Möglichkeit von MIP-1 $\beta$ , Oligomere zu bilden, ist wichtig für die in vivo-Rekrutierung von Zellen in die Peritonealhöhle bei Mäusen (61). MIP-1 $\beta$  ist äußerst effektiv bei der Adhäsion von CD8(+) T-Zellen an das vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) (81). Die Serumkonzentration von MIP-1 $\beta$  ist bei bakteriellen Entzündungen signifikant höher als bei viralen Infekten (69). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die MIP-1 $\beta$ -Konzentration im Aszites bei SBP signifikant höher war als in der Vergleichsgruppe (81).

### **2.1.6. RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor, CCL5)**

Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor (RANTES) gehört zur Familie der CC-Chemokine (CCL5) und wurde 1988 von Schall et al. entdeckt (82). Es hat starke chemotaktische Effekte auf viele Immunzellen, darunter Eosinophile, Basophile, Mastzellen, Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten sowie NK-Zellen und kann die Funktion von Effektorzellen modulieren (83). Die Expression von RANTES wird in den T-Lymphozyten durch den Kruppel-like factor 13 (KLF13) reguliert (84)(85). Mit Hilfe bestimmter Zytokine wie z.B. IL-2 und IFN- $\gamma$ , welche durch T-Zellen freigesetzt werden, induziert RANTES die Proliferation und Aktivierung von bestimmten NK-Zellen CHAK-Zellen (CC-Chemokin aktivierte Killerzellen) zu formen (86). RANTES interagiert mit CCR1, CCR3 und CCR5 (78). Die Domäne, welche für die Signaltransduktion zuständig ist, ist im N-Terminus gelegen: bei einem mutierten Fehlen des N-Terminus kann immer noch an Zielzellen gebunden werden, jedoch kein chemotaktischer Einstrom von Kalziumionen mehr induziert werden. Die Möglichkeit von RANTES, Oligomere zu bilden, ist wichtig für die in vivo Rekrutierung von Zellen in die Peritonealhöhle bei Mäusen (61). RANTES induziert die schnelle Expression der Transkription der CXC-Chemokine KC und MIP-2, der CC-Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  sowie der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (87)(86). Weil es die Leukozytenfiltration zu Entzündungen induzieren kann, wurde RANTES zunächst als typisches chemotaktisches Zytokin angesehen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass RANTES multiple Effekte wie die Förderung von Tumorinvasion, Metastasierung und Antitumor-Eigenschaften während des



Auftretens von Tumoren und der Entwicklung von Malignität hat (88). Die Antitumor-Funktion könnte z.B. durch Tumorzellen in eine tumorfördernde Funktion umgewandelt werden; der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt. Die Antitumor-Aktivität von RANTES wurde vielfach erforscht (89)(90)(91)(92)(93) mit den anzunehmenden Ergebnissen, dass RANTES an der Aktivierung und Chemotaxis von T-Zellen teilhat, damit Antitumor-Effekte produziert werden können und die Bildung einer spezifischen CTL-Antwort induziert werden kann, um seine Antitumor-Aktivität effektiv ausüben zu können.

## **2.2. Übersicht über weitere Zytokine: Interferone (IFN- $\gamma$ ), Interleukine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A) und Tumornekrosefaktoren (TNF- $\alpha$ )**

Neben den vorbeschriebenen Chemokinen gibt es im Wesentlichen noch vier weitere Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF).

Interferone sind eine Gruppe von Signalproteinen, welche durch Wirtszellen als Antwort auf anwesende Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Tumorzellen gebildet werden (94). Typischerweise setzt eine Virus-infizierte Zelle Interferone frei, wodurch nahegelegene Zellen ihre virale Abwehr erhöhen. IFN- $\gamma$  gehört zum Interferon Typ II, welcher durch IL-12 aktiviert wird und an den Interferon-Gamma-Rezeptor (IFNGR) bindet (95). Sie werden einerseits durch T-Helferzellen Typ 1 freigesetzt und blockieren andererseits die Proliferation von T-Helferzellen Typ 2. Außerdem können sie direkt andere Immunzellen wie Makrophagen oder NK-Zellen aktivieren.

Interleukine sind eine Gruppe von Zytokinen, von welchen zuerst bekannt war, dass sie von Leukozyten gebildet werden (96). Die Funktion des Immunsystems hängt größtenteils von Interleukinen ab. Insbesondere IL-1, IL-6 und IL-8 werden bei Akute-Phase-Reaktionen sezerniert. IL-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  nehmen proinflammatorisch an der Regulation von Immunantworten, entzündlichen Reaktionen wie Fieber und Sepsis sowie der Hämatopoese teil (97). IL-1 $\alpha$  wird hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen und Neutrophile, aber auch Epithelzellen und Endothelzellen produziert. Es bindet wie IL-1 $\beta$  an den IL-

IL-1-Rezeptor, erhöht die Anzahl an Neutrophilen und ist an der Aktivierung des Akute-Phase-Proteins TNF- $\alpha$  beteiligt (98). Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) wirkt hingegen antiinflammatorisch: es bindet nicht-produktiv an die Zelloberfläche des Interleukin-1 Rezeptors und verhindert dadurch, dass IL-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  Signale an diese Zelle senden können (99). IL-4 wird während Immunantworten vom zytotoxischen Typ durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen produziert und unterstützt B-Zellen bei der Proliferation verbunden mit einem Klassenwechsel zu den IgG1 und IgE Isotypen (100). IL-6 wird durch T-Zellen und Makrophagen sezerniert und wirkt sowohl pro- als auch antiinflammatorisch. Es spielt eine essentielle Rolle in der finalen Differenzierung von B-Zellen in Ig-sezernierende Zellen, stimuliert Neutrophile und ist als Zytokin ein wichtiger Mediator bei Fieber und Akute-Phase-Reaktionen (101). Andererseits hat IL-6 in seiner Rolle als Myokin einen inhibitorischen Effekt auf TNF- $\alpha$  sowie IL-1 und aktiviert IL-1RA und IL-10 (102). IL-10 wirkt antiinflammatorisch: es inhibiert die Antigenpräsentation sowie die Synthese einiger Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF und CSF, welche durch aktivierte Makrophagen und T-Helferzellen produziert werden. Des Weiteren erhöht IL-10 die Freisetzung von IL-1RA (103). IL-17A ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches durch IL-23 induziert und aktivierte T-Helferzellen produziert wird. Es wirkt als Mediator bei allergischen Reaktionen vom Spättyp (104) und steigert die Chemokin-Produktion, um Monozyten und Neutrophile zu Entzündungsorten zu rekrutieren. IL-17A arbeitet synergistisch mit IL-1 und TNF- $\alpha$  (105)(106).

Tumornekrosefaktoren sind eine Gruppe von Zytokinen, welche Apoptose induzieren können. TNF- $\alpha$  ist in systemische Entzündungsreaktionen involviert und fördert Akute-Phase-Reaktionen. Es wird hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen produziert (107), aber auch durch CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophile, Mastzellen, Eosinophile und mutmaßlich Neuronen (108). Es wirkt stark chemotaktisch auf Neutrophile und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, welche die Migration von Neutrophilen unterstützen (107). Eine lokale Konzentrationserhöhung von TNF- $\alpha$  führt zum Auftreten der Kardinalzeichen einer Entzündung: Hitze, Schwellung, Rötung, Schmerz und Funktionsverlust.

### **3. Material und Methoden**

Im Folgenden soll eine Zusammenfassung über die klinische Charakterisierung und Erfassung des Patientenkollektivs, sowie der Probengewinnung und deren Auswertung gegeben werden.

#### **3.1. Akquirierung des Patientenkollektivs**

An der Studie nahmen im Zeitraum vom 12.05.2009 bis 24.05.2011 insgesamt 214 Patienten teil. 65 Patienten stammten aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I (Station 10, 14, 15, 92) sowie Innere Medizin II (Station 93) der Universität Regensburg. Es wurden die Proben und Daten weiterer 75 Patienten aus Bonn und 74 Patienten aus Jena zur Auswertung übersandt. Im Rahmen der klinisch prospektiv angelegten Studie wurde bei all diesen Patienten eine Parazentese des mithilfe von Ultraschall oder Computertomographie nachgewiesenen Aszites durchgeführt.

Einschlusskriterien waren die Detektion des Aszites unabhängig von der zugrundeliegenden Genese des Aszites, klinische Notwendigkeit einer Parazentese, Einverständniserklärung des Patienten und ein Alter über 18 Jahre. Ausschlusskriterien beinhalteten das Bestehen einer Schwangerschaft, Notwendigkeit einer Peritonealdialyse oder ein stattgehabter bauchchirurgischer Eingriff innerhalb der letzten drei Monate vor Studienteilnahme. Von den 214 Patienten, bei denen insgesamt 265 Parazentesen durchgeführt wurden, erfüllten alle Patienten diese Kriterien. Davon wurde bei 171 Patienten simultan Serumblut abgenommen.

#### **3.2. Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs**

Vor und nach der Parazentese wurde bei jedem Patienten ein mehrtägiges Studienfollow-up durchgeführt. Hierbei wurden die Vorgeschichte, die klinische Präsentation des Patienten, diagnostische Befunde und therapeutische Maßnahmen dokumentiert.

**Untersuchungscharakteristika der Studienkohorte**

Geschlecht (m/w)
BMI kg/m <sup>2</sup>
Alter
Vorkommen einer Leberzirrhose
Schweregrad der Leberzirrhose (nach Child-Pugh und MELD)
Ursache der Leberzirrhose: Alkohol, Chronische Hepatitis B/C, Andere n, Unbekannt n
Vorkommen von Aszites
Ursache des Aszites: Portale Genese, Maligne Genese, Kardiale Genese, Andere Genese
Vorkommen eines hepatozellulären Karzinoms
Vorkommen einer Peritonitis

Tab. 1: Charakterisierung der Studienkohorte

**3.2.1. Bestimmung der Basisparameter**

Im Rahmen der Patientencharakterisierung wurde die Studiengruppe anhand des Geschlechts aufgeteilt und das mittlere Alter der Probanden errechnet. Von jedem Patienten wurden das Körpergewicht nach Durchführung der Parazentese und die Körpergröße gemessen, um hieraus den Body Mass Index (BMI) zu berechnen.

**3.2.2. Unterscheidung der Patienten hinsichtlich Vorhandensein, Schweregrad und Genese einer Leberzirrhose**

Die Studiengruppe wurde in Probanden mit und ohne Leberzirrhose unterteilt. Die Evaluierung des Schweregrads der Zirrhose fand mithilfe des Child-Pugh-Scores und des MELD-Scores statt. Bei Patienten mit Leberzirrhose fand eine Unterteilung in die Untergruppen alkoholassoziierte Leberzirrhose, Leberzirrhose aufgrund einer Infektion mit Hepatitis-B-Virus/Hepatitis-C-Virus (HBV/HCV) und Leberzirrhose anderer Genese statt.

**3.2.2.1. Diagnostik der Leberzirrhose und Erfassung der Folgeerscheinungen**

Der Begriff Zirrhose leitet sich aus dem griechischen „kirrhos“ ab und bedeutet gelbbraun, analog zur braunen Farbe der Leber (109). Die Leberzirrhose ist eine histologische Diagnose, die auf drei wesentlichen Kriterien basiert: diffuse

Erkrankung mit Ausbildung bindegewebiger Septen (110), Vorhandensein einer Fibrose und Ersatz des gesunden Lebergewebes durch abnorme knotige Strukturen bzw. Bildung von Regeneratknoten (111). Zur eindeutigen diagnostischen Sicherung einer etwaig vorliegenden Leberzirrhose wurde deswegen eine histologische Untersuchung durch eine perkutane Biopsie bei denjenigen Patienten angestrebt, welche in der Vorgeschichte noch keine histologische oder laparoskopische Abklärung einer Leberzirrhose aufweisen konnten.

Auf Grund der Komplikationsgefahr musste bei schweren Blutgerinnungsstörungen oder Aszites auf die perkutane Leberpunktion verzichtet werden. Hier konnte alternativ der Nachweis zirrrosotypischer Zeichen in der Bildgebung (knotige Leberoberfläche, Veränderung der Anatomie der Lebersegmente, Aszites, portale Hypertension mit Splenomegalie oder Kollateralkreisläufen) weiteren Aufschluss geben (112). Die sonographische Diagnostik wurde mit Geräten der Firma Mindray DP 1100 Plus Sonoring, Schmitt-Haverkamp, Hitachi CS9200 Computer Sonograph, und Hitachi EUB 8500 durchgeführt. Im Hinblick auf die Zirrhosedagnostik beträgt die Sensitivität und Spezifität des hochauflösenden Ultraschalls jeweils etwa 90% (113). Eine transjuguläre Leberbiopsie oder neuere Methoden wie eine Minilaparoskopie zur Diagnose einer Leberzirrhose, Abklärung unklarer Leberherde oder zur Aszitesdiagnostik, die durch Arbeiten von Denzer und Lohse 1996 zum ersten Mal entwickelt wurden, fanden keine Anwendung (114)(115).

Zur Diagnose einer Leberzirrhose wurden zudem klinische Parameter herangezogen. So wurde während der Patientenuntersuchung insbesondere auf sogenannte Hautzeichen einer Leberzirrhose wie Ikterus mit Pruritus und Kratzeffloreszenzen, Spider naevi, Hautatrophie mit Teleangiektasien, Lacklippen, Lackzunge, Mundwinkelrhagaden, Weißnägel, Palmar- und Plantarerythem, Dupuytren-Kontrakturen (111) oder Caput medusae mit typischen umbilicalen Kollateralen als Zeichen einer portalen Hypertension geachtet (116). Des Weiteren wurden folgende Symptome einer gestörten endokrinen Funktion untersucht bzw. erfragt: bei Frauen wurden Menstruationsstörungen (sekundäre Amenorrhö) und bei Männern das Vorliegen einer Hodenatrophie, einer Gynäkomastie, eines Libidoverlustes,

einer Potenzstörung (Impotenz) und/oder ein Abnehmen der Sekundärbehaarung dokumentiert. Die initiale Labordiagnostik zur Diagnose und Schweregradeinteilung einer Leberzirrhose beinhaltete die Bestimmung von Serumtransaminasen, Bilirubin, alkalischer Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Albumin, Kreatinin, Natrium sowie ein Blutbild mit Thrombozytenzahl, Quick und INR.

Außerdem wurden die Folgen einer Leberzirrhose anhand folgender Parameter eingeteilt: Ösophagusvarizen wurden endoskopisch mit Geräten der Firma Olympus GIFQ 160, GIF 1T140, GIF1TQ160 und Fujinon EG 450 CT5, Fujinon WR530 nachgewiesen. Anhand Aussehen und Eigenschaften während der Endoskopie wurde eine Stadieneinteilung in Grad I-IV erhoben. Varizenblutungen und deren Intervention nach Baveno IV Konsensuskriterien von 2005 wurden dabei gesondert dokumentiert. Ein Hepatorenales Syndrom (HRS) wurde gemäß der Richtlinien des „Internationalen Aszites Club“ (117) bestimmt. Hiernach wird ein HRS durch das Vorhandensein von fünf Kriterien (schwere Zirrhose, glomeruläre Hypofiltration, keine anderen funktionellen oder organischen Ursachen, fehlende Plasmavolumenausdehnung, keine Proteinurie) definiert; es kann zwischen einem Typ 1 mit einer rapiden Verschlechterung der Nierenfunktion und einem Typ 2 mit einer langsam progressiven Nierenfunktionseinschränkung unterschieden werden (118). Eine hepatische Enzephalopathie wurde anhand psychomotorischer Symptome und Komatiefe in deren klinische Schwere nach West Haven Kriterien (119)(120) eingestuft. Dabei werden fünf Stadien in Anbetracht von Bewusstseinslage/Intellekt, Verhalten und neuromuskulären Symptomen unterschieden (121). Die Einteilung erfolgte nach Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen mit Hilfe klinischer Untersuchung des mentalen Status.

### **3.2.2.2. Unterscheidung des Schweregrads der Leberzirrhose**

Für die Evaluierung des Schweregrads der Leberzirrhose wurden der Child-Pugh-Score und MELD-Score herangezogen.

Die Child-Pugh-Kriterien wurden erstmals von Dr. C. G. Child und Dr. J. G. Turcotte (Universität von Michigan) publiziert, weshalb auch der Begriff Child-Turcotte-Pugh Score synonym gebraucht werden darf. Diese Kriterien wurden

1972 von Pugh modifiziert. Der Child-Pugh-Score dient der Prognoseabschätzung (122).

Der MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease) wurde 2000 von Dr. P. Kamath entwickelt und 2002 durch die US-amerikanische Organtransplantationsgesellschaft United Network for Organ Sharing modifiziert. Er dient der Mortalitätsabschätzung von Patientin im Endstadium einer Leberzirrhose vor Lebertransplantation (123).

Tabelle 2 fasst die Parameter zusammen, die für die Zuordnung der Studienpatienten in die jeweilige Child-Pugh-Klasse verwendet wurden. Abbildung 1 zeigt die Formel zur Berechnung des MELD-Scores.

Child-Turcotte-Pugh Classification for Severity of Cirrhosis			
Clinical and Lab Criteria	Points*		
	1	2	3
Encephalopathy	None	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4
Ascites	None	Mild to moderate (diuretic responsive)	Severe (diuretic refractory)
Bilirubin (mg/dL)	< 2	2-3	>3
Albumin (g/dL)	> 3.5	2.8-3.5	<2.8
Prothrombin time Seconds prolonged or International normalized ratio	<4  <1.7	4-6  1.7-2.3	>6  >2.3
*Child-Turcotte-Pugh Class obtained by adding score for each parameter (total points)			
Class A = 5 to 6 points			
Class B = 7 to 9 points			
Class C = 10 to 15 points			

Tab. 2: Mithilfe laborchemischer (Gesamtbilirubin, Serumalbumin, INR) und klinischer Parameter (Beurteilung des Vorhandenseins und dem Grad der Ausprägung eines Aszites und / oder einer hepatischen Enzephalopathie) lässt sich ein Punktwert berechnen, der den Patienten in die Child-Pugh Klasse A (5-6 Punkte), B (7-9 Punkte) oder C (≥10 Punkte) einordnet.

$$\text{MELD-Score} = 10 \times (0.957 \times \ln (\text{Serumkreatinin mg/dl}) + 0.378 \times \ln (\text{Bilirubin ges. mg/dl}) + 1.12 \times \ln (\text{INR}) + 0.643)$$

Abb. 2: Mithilfe laborchemischer (Serumkreatinin, Gesamtbilirubin, INR) Parameter lässt sich der MELD-Score berechnen. Er liegt zwischen 6 und 40 Punkten: je höher der Wert, desto höher ist das 3 Monats-Mortalitätsrisiko.

### 3.2.2.3. Unterscheidung der Ätiologie der Leberzirrhose

Im westeuropäischen Raum ist der häufigste Auslöser einer Leberzirrhose mit 50% Alkohol, gefolgt mit 40% von den viralen Hepatitiden B und C und lediglich 10% anderen Ursachen (115). In Anlehnung an diese Häufigkeitsverteilung wurden die Patienten in die ätiologischen Gruppen „Alkoholische Zirrhose“, „Hepatitis B/C“ und „Andere Genese“ unterteilt. Tabelle 3 ist eine Aufstellung der diagnostischen Parameter, die für die Unterteilung der Patienten in die drei Subgruppen genutzt wurden.

	Art der Zirrhose	Diagnostik
Studiengruppe 1	Alkoholische Zirrhose	Anamnese des Alkoholabusus,* Histologie
Studiengruppe 2	Hepatitis B	HBsAg und HBeAg, evtl. HBV-DNA
	Hepatitis C	Anti-HCV, HCV-RNA
Studiengruppe 3: Andere Ursache	Primär biliäre Zirrhose	Antimitochondriale Antikörper Subtyp M2, IgM, Histologie
	Primär sklerosierende Cholangitis	ERCP, p ANCA, Rekto-Koloskopie, evtl. Histologie
	Autoimmunhepatitis	Hypergammaglobulinämie, IgG, antinukleäre Antikörper, Histologie
	Hämochromatose	Familienanamnese, erhöhte Transferrinsättigung und Ferritin, quantitative Eisenbestimmung im Leberpunktat, Mutationsscreening
	Morbus Wilson	Kupferausscheidung im 24-h-Sammelurin
	Kardiale Zirrhose	Herzultraschall, Ultraschall der Leber
	Nichtalkoholische Steatohepatitis	Histologie, fehlende Alkoholanamnese

\*Zur Validitätsüberprüfung- und Strukturierung der Angaben wurde ein Fragebogen zu Alkoholkonsum und Lebensgewohnheiten angefertigt und bei den Studienteilnehmern der verschiedenen Studiengruppen angewandt.

Tab. 3: Diagnosekriterien zur Klärung der Ätiologie der Leberzirrhose für die Einteilung in die Studiengruppen 1 - 3



### 3.2.3. Charakterisierung des Aszites

Der Terminus Aszites stammt vom griechischen Wort für Wassersucht („askites“) ab und ist heute als seröse Flüssigkeitsansammlung in der freien Peritonealhöhle definiert. Die Ursache einer Aszitesbildung ist in etwa 80% - 85% der Fälle in einer zirrhotischen Lebererkrankung zu finden, während Auslöser wie Herzinsuffizienz, Pankreatitis, nephrotisches Syndrom oder Austritt von Galle eher selten sind. Bei ungefähr jedem zehnten Patienten mit Aszites liegt die Ursache in einer malignen Krebserkrankung. In vier von fünf Fällen sind hierfür Ovarialkarzinome oder gastrointestinale Tumore verantwortlich, seltener Tumore von Mamma, Pulmo, Uterus und Zervix (124)(123). Tabelle 4 fasst die häufigsten Ursachen zusammen.

Ausgewählte Ursachen einer Aszitesentwicklung	Häufigkeit in %
<b>Portal</b> (Leberzirrhose, andere Ursachen portaler Hypertonie)	80 – 85
<b>Maligne</b> (Peritonealkarzinose, Tumore der weiblichen Geschlechtsorgane, Gastrointestinale Tumore)	10
<b>Kardial</b> (Rechtsherzversagen, schwere Herzinsuffizienz)	3
<b>Pankreatogen</b> (akute Pankreatitis und Pankreasfisteln)	<1
<b>Entzündlich</b> (bakteriell, tuberkulös)	<1
<b>Biliär</b> (Leckage nach Gallen-OP, Gallenblasen-Ruptur/-Perforation)	<1
<b>Andere</b> (z.B. chylös oder nephrogen)	<1

Tab. 4: Übersicht über die Entitäten und Ursacheneinteilung peritonealer Flüssigkeit

In Anlehnung an diese Häufigkeitsverteilung wurden die Patienten in die Subgruppen „portale“, „maligne“, „kardiale“, „pankreatogene“ und „andere“ Genese des Aszites unterteilt. Bei der Ursachensuche und Eingruppierung der Patienten waren Anamnese, klinische Untersuchung, abdominelle Sonographie und gegebenenfalls weitere Bildgebung, sowie klinisch-chemische oder bakteriologische Zusatzuntersuchungen in den meisten Fällen diagnoseweisend. Dennoch spielten insbesondere zur Differenzierung eines portalen von einem malignen Aszites klinisch-chemische Parameter im Aszites eine wichtige Rolle.

### **3.2.3.1. Differenzierung des Aszites in portale, kardiale oder andere Genese**

Der Serum-Aszites Albumin Gradient“ SAAG-Wert (Albuminkonzentration im Serum minus Albuminkonzentration im Aszites) ist der bedeutsamste Parameter als Hinweis auf eine portale Genese des Aszites. Die Bestimmung des SAAG-Wertes ist dabei dem orientierenden Exsudat-Transsudat-Konzept in der Differentialdiagnose des Aszites deutlich überlegen (125)(124). Nach Ausschluss einer kardialen Ursache kann bei einem SAAG von  $>1,1$  g/dl mit einer Sensitivität von nahezu 100% und einer Spezifität von circa 95% von einer portalen Genese des Aszites ausgegangen werden. Ähnlich sensitiv und mit einer Spezifität von etwa 85% ist die Bestimmung der Albuminkonzentration im Aszites ( $<2,0$  g/dl). Zur Ergänzung wurden das Aszites-/Serumalbuminverhältnis ( $<0,65$ ), das Aszites-/Serumeiweißverhältnis ( $<0,5$ ) und der Aszitesgesamteiweißgehalt ( $<2,5$  g/dl) mit einer Spezifität von 80% und einer Sensitivität von 90% herangezogen. Letztgenanntem Parameter wurde eine besondere Bedeutung in der Differenzierung zwischen einer portalen und einer kardialen Genese beigemessen: während bei beiden Aszitesarten in der Regel ein SAAG-Wert  $>1,1$  g/dl vorliegt, lässt sich im Gegensatz zum portalen Aszites in nahezu 100% der Fälle eine Gesamteiweißkonzentration von  $>2,5$  g/dl im kardialen Aszites finden. Im Unterschied zur portalen und kardialen Genese des Aszites findet sich in aller Regel bei den übrigen Ursachen eines Aszites ein SAAG-Wert  $<1,1$  g/dl. Eine pankreatogene Genese kann bei einer Aszites-/Serumamylasekonzentration  $> 1$  angenommen werden; diese wurde jedoch nicht standardmäßig durchgeführt. Eine Erhöhung der Triglyzeride  $>200$  mg/dl spricht für eine chylöse Genese (126).

### **3.2.3.2. Maligner Aszites und Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit und ohne hepatozellulärem Karzinom**

Bei Verdacht auf eine maligne Genese des Aszites wurde ein Nachweis von Tumorzellen mittels Zytologie, sowie die Bestimmung von Tumormarkern (CEA, CA19-9) angestrebt. Beide Methoden sind zwar hochspezifisch, weisen jedoch nur eine Sensitivität von höchstens 80% bei der Zytologie bzw. 45% bei den

Tumormarkern auf. Es wurde weiterhin der Aszitesgesamteiweißgehalt ( $>2,5$  g/dl) mit einer Spezifität von 70% und einer Sensitivität von 75% herangezogen. In Einzelfällen konnte der Aszitescholesterinwert ( $>45$  mg/dl) mit einer Spezifität von 70% und einer Sensitivität von 80% sowie der Aszites-/Serum-LDH-Wert ( $>1,0$ ) mit einer Spezifität von 75% und einer Sensitivität von 60% bestimmt werden (126).

In der Regel wurde bei den Patienten mit nachgewiesener Leberzirrhose ein sonographisches Screening auf maligne Raumforderungen der Leber durchgeführt. In einigen Fällen erfolgte die hausärztliche Überweisung oder Übernahme aus peripheren Krankenhäusern zur weiteren Abklärung suspekter Leber Raumforderungen. In einzelnen Fällen lag ein bereits bekanntes oder auswärtig gesichertes, manifestes HCC vor.

Die Diagnose eines HCC bei Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose wurde nach den „European Association for the study of the liver“ (EASL) – Kriterien zytologisch bzw. histologisch oder nicht-invasiv gestellt (127). Dies geschah bei Läsionen mit einer Größe über 2 cm durch übereinstimmende Sicherung von zwei unabhängigen bildgebenden Verfahren mit HCC-typischer, arteriell hypervaskularisierter Läsion oder durch ein bildgebendes Verfahren mit HCC-typischer Läsion und einer AFP-Konzentration von  $>400$  ng/ml. Als bildgebende Verfahren wurden Kontrastmittelsonographie, Spiral-CT mit mehreren KM-Phasen, MRT oder seltener Angiographie genutzt. Damit konnte in der Mehrzahl der Fälle eine eindeutige Differenzierung zwischen benigner oder maligner Entität getroffen werden. Bei einer Größe der Läsion zwischen 1 cm und 2 cm oder unklarer Dignität wurde eine CT- oder seltener Sonographie-gesteuerte, perkutane Leberbiopsie zur zytologischen bzw. histologischen Untersuchung durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Methoden wurde bei 27 Patienten ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) gefunden oder bestätigt.

#### **3.2.4. Einteilung der Patienten hinsichtlich Vorhandensein und Genese einer Peritonitis**

Als Ursache eines infizierten Aszites muss insbesondere zwischen einer spontan-bakteriellen Peritonitis (SBP) und einer sekundären bakteriellen

Peritonitis unterschieden werden. Freie abdominelle Luft in der Bildgebung bzw. der Nachweis eines multi-mikrobiellen Aszites können Zeichen einer sekundären bakteriellen Peritonitis sein. An Laborparametern weisen ein Glucosegehalt  $<50$  mg/dl, eine Alkalische-Phosphatase-Konzentration im Aszites  $>240$  U/l, ein Aszites-CEA  $>5$  ng/ml, LDH  $>225$  U/l, Gesamtprotein  $>10$  g/l oder eine Granulozytenzahl  $>5000$ /ml im Aszites auf eine sekundäre Peritonitis hin (128)(129).

Während eine SBP bei circa 10-25% aller Fälle eines portalen Aszites bei hospitalisierten Zirrhosepatienten mit Aszites auftritt, ist die sekundäre Peritonitis etwa zehnmal so selten. Da letztere häufig durch eine intestinale Perforation verursacht ist, sind fast immer mehrere Erreger und meist auch Anaerobier auffindbar. Im Gegensatz hierzu ist bei der SBP überwiegend nur ein Erreger nachzuweisen, in etwa 80% der Fälle handelt es sich um gramnegative Keime (130). Häufigster Erreger ist *Escherichia coli*, gefolgt von *Klebsiella*-Spezies und anderen gram-negativen Keimen der intestinalen Flora (z.B. *Enterococcus faecialis*). Grampositive Bakterien, am häufigsten Streptokokken-Spezies, werden in 20% aller Fälle gefunden (130). Anaerobier treten in nicht mehr als 5% der Fälle auf (130).

Im Rahmen der frühzeitigen Erkennung einer SBP wurde bei den Patienten insbesondere auf abdominelle Schmerzen, Peritonismus und Entwicklung von Fieber geachtet. Dies galt ebenso für weitere Hinweise auf eine möglich entstehende SBP, wie das Auftreten oder die Verschlechterung einer hepatischen Enzephalopathie, eine Hypotonie, ein Kreatininanstieg und/oder Rückgang der Diurese bis hin zum Nierenversagen (131). Da bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites jedoch jegliche Art der Zustandsverschlechterung sowie ein therapierefraktärer Aszites auch ohne ausgeprägte Zeichen einer Infektion an das Vorliegen einer SBP denken lassen (131), wurde in diesen Fällen eine frühzeitige Diagnostik in Form von Aszitespunktion und mikrobiologischer Evaluation angestrebt.

Eine SBP wird durch einen neutrophilen Granulozytenwert („polymorphonuclear neutrophils“ PMN) von  $>250$  Zellen/ $\mu$ l im Aszites definiert. Bei gleichzeitigem kulturellen bakteriellen Nachweis spricht man von einer kultur-positiven SBP. Ein „Bakteraszites“ ist hingegen durch einen PMN  $<250$  Zellen/ $\mu$ l bei kulturellem bakteriellen Nachweis definiert (132). Zum Kulturnachweis wurden

BacT/ALERT Kultursysteme verwendet. Um eine mögliche Verbindung zwischen Chemokinen im Aszites und dem Bestehen einer Peritonitis unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache (SBP/sekundäre Peritonitis) zu untersuchen, wurde eine Peritonitis jedweder Genese durch einen mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis und/oder einen neutrophilen Granulozytenwert  $>250/\mu\text{l}$  definiert.

### **3.3. Aufklärung der Patienten**

Jeder Patient wurde ausführlich über Inhalt und Risiken der Studie aufgeklärt und es wurde eine schriftliche Einverständniserklärung des Patienten eingeholt. Sofern die Einwilligungsfähigkeit eines Patienten z.B. aufgrund der Schwere der Erkrankung nicht gegeben war, wurde die Studienteilnahme mit Angehörigen oder den gesetzlichen Betreuern besprochen. Die Teilnahme an der Studie wurde schriftlich bestätigt. Die Aufklärung umfasste zudem eine Datenschutzerklärung, bei der jeder Patient schriftlich einwilligte, dass personenbezogene Daten, insbesondere Daten über den Gesundheitszustand des Patienten, über einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren aufbewahrt werden dürfen. Eine gesonderte Einverständniserklärung wurde zudem von jedem Patienten für die Venenpunktionen zur Blutprobengewinnung eingeholt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

### **3.4. Asservierung der Proben**

Die Aszitesproben wurden sowohl im Rahmen von diagnostischen, als auch therapeutischen Punktionen gewonnen. Nach Einholung des Einverständnisses des Patienten und schriftlicher Dokumentation erfolgte nach sonographischer Darstellung der Aszitesmenge eine Markierung einer günstigen Punktionsstelle mit möglichst großem Abstand zu verletzbaren Organen oder Gefäßen (A. epigastrica inferior am lateralen Rand des M. rectus abdominis, portale Umgehungskreisläufe und wiedereröffnete fetale Gefäße). Zumeist wurde im Bereich des Monroepunktes (im dritten lateralen Viertel einer Linie zwischen Bauchnabel und Spina iliaca anterior superior), bevorzugt linksseitig, direkt

punktiert mit sofortigem Rückzug der Nadelspitze, sobald Aszites aspiriert wurde.

Zum Ablassen der meist serösen Flüssigkeit wurde eine für diese Zwecke entwickelte 6-French „Schlottmann-Parazentese-Nadel“ mit steifer Führung, Seitenlöchern und einer der äußeren Bauchdecke zugewandten praktischen Fixierungsplatte verwendet (siehe Abbildung 2). Wenngleich die Kosten höher sind, bietet diese Nadel im Vergleich zu herkömmlichen Punktionen mit einer Venenverweilkanüle bezüglich der Notwendigkeit und Anzahl der Lageänderungen der Nadel während der Punktion, der Notwendigkeit einer erneuten Punktion, der subjektiven Praktikabilität der Parazentese und somit der Patientenakzeptanz eine signifikante Überlegenheit (133).

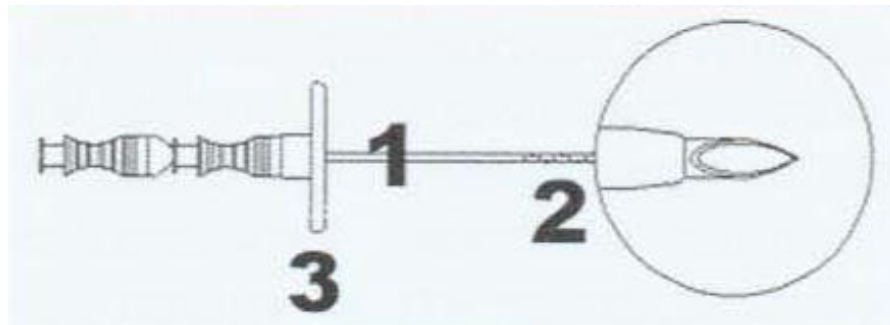


Abb. 3: Schlottmann-Parazentese-Nadel mit steifer Drainage-Führung (1), Seitenlöchern (2) und Fixierungsplatte (3)

Der gewonnene Aszites wurde in Serummonovetten grau-weiß 5,5 ml überführt und im Anschluss zehn Minuten bei 4000 rounds per minute (rpm) zentrifugiert (Zentrifuge Typ Biofuge primo R, Heraeus Instruments, Gera, Deutschland). Der Überstand wurde in sechs Eppendorfcups zu je 1,5 ml aliquotiert, die ggf. makroskopisch vorhandenen Pellets wurden ebenso in Eppendorfcups asserviert. Das gleiche Prozedere wurde im Rahmen der Serumgewinnung durchgeführt. Beide Probenarten wurden beschriftet und direkt im Anschluss bei -20 °C eingefroren.

### 3.5. Chemokinbestimmung

Die Chemokine IL-8 (n = 103) sowie Eotaxin, MCP-1 und RANTES (jeweils n = 116) wurden im Aszites, die Chemokine MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  wurden in Aszites

(jeweils  $n = 221$ ) und Serum (jeweils  $n = 216$ ) quantifiziert. Die untersuchten Chemokine wurden mittels Multiplex-Luminex Technik mit dem MILLIPLEX MAP Kit der Millipore Corporation (Billerica, MA, USA) bestimmt.

### **3.5.1 Testprinzip der Multiplex-Luminex Technik**

Mit der Luminex xMAP-Technologie ist es möglich, die simultane Analyse von bis zu 100 Parametern in einer Probe und einem Messvorgang durch eindeutig definierte Spektralsignaturen und Nachweisreagenzien durchzuführen. Grundlage hierfür sind mikroskopisch kleine Polystyrolpartikel, sogenannte Mikrosphären oder Beads, die analog zu Western Blot und ELISA als Festphase für verschiedene biochemische Nachweisreaktionen dienen.

Multiplex-Assays werden direkt in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Sie enthalten eine Mischung verschiedener Mikrosphären-Typen (Bead-Mix). Jeder dieser Bead-Typen ist eindeutig durch einen individuellen roten Fluoreszenzfarbton definiert und trägt auf der Oberfläche ein spezifisches Nachweisreagenz wie z.B. rekombinantes Antigen, Oligonukleotide oder spezifische Proteine. Die zu untersuchenden Proben werden mit dem Bead-Mix inkubiert, dabei bindet jeder Bead-Typ an sein spezifisches Zielmolekül (Analyt). Der spezifische Nachweis der Bindung der Analyten an die Beads erfolgt über ein Detektionsmolekül (Konjugat), das eine hohe Affinität zum Analyten besitzt. Das Konjugat ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, dessen spektraler Bereich sich von denen der Beadfarbstoffe unterscheidet. Auf diese Weise können die Klassifizierung der Beads und die Quantifizierung des Analyten nebeneinander durchgeführt werden. Die Analyse und Auswertung der Bead-basierten Tests erfolgt mit dem Luminex-Analysesystem. Es basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie unter Verwendung zweier unterschiedlicher Laser. Über die XY-Plattform können die Proben vollautomatisch gemessen und ausgewertet werden.

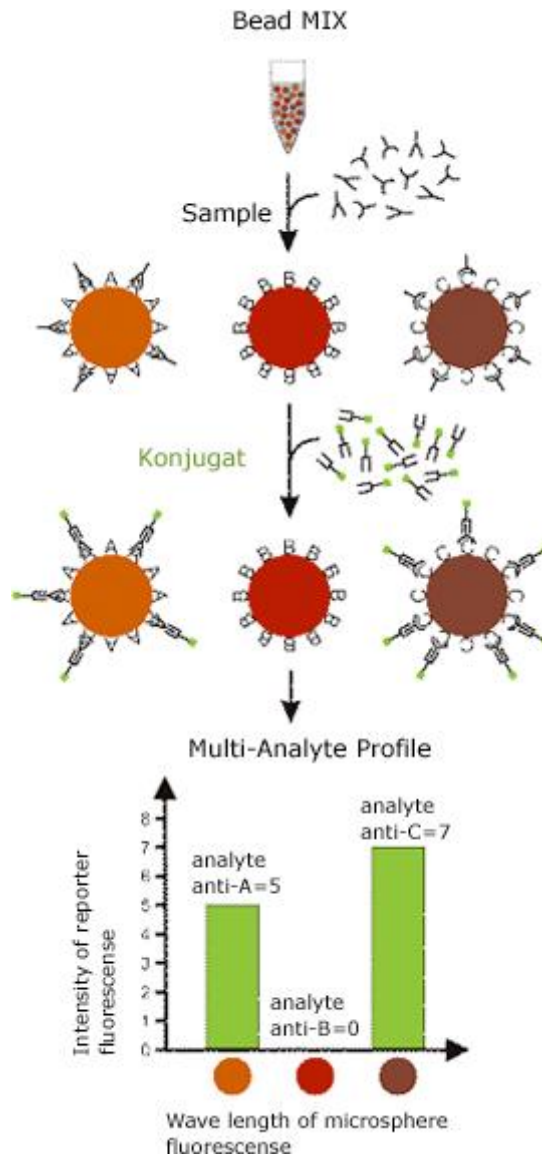


Abb. 4: Prinzip Multiplex-Luminex: Inkubation der Probe mit dem Bead-Mix und Bindung der Bead-Typen an ihre spezifischen Zielmoleküle (Analyt), erneute Inkubation mit Markern (Konjugat) und Analyse der Beads anhand ihrer z.B. roten (Bead-Klassifizierung) und grünen (Quantifizierung) Fluoreszenz

Mit Bead-basierten Assays können somit in einem Ansatz mehrere Analyten simultan bestimmt und dadurch Zeit, Kosten und Material gespart werden (135). Das Resultat sind Multi-Analyten-Profile mit deutlich verbesserter Aussagekraft im Vergleich zum Einzelnachweis von verschiedenen Parametern. Bead-basierte Assays zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Weitere Vorteile liegen darin, dass für die Testdurchführung nur sehr geringe Probenvolumina benötigt werden und die Messsignale über 3-4 Größenordnungen linear sind (135).



### 3.5.2. Benötigte Materialien und Probenvorbereitungen

Durch den Hersteller Millipore zur Verfügung gestellte Reagenzien:

- Humane Zytokine / Chemokine Standard, 1 Phiole, lyophilisiert
- Humane Zytokine Qualitätskontrolle 1 und 2, 2 Phiole, lyophilisiert
- Serum Matrix (enthält 0,08% Natriumazid), 1 Phiole, lyophilisiert
- Set aus einer 96-Well-Filterplatte mit 2 Verschlüssen
- Assay-Puffer, 1 Fläschchen, 30ml
- 10x Waschpuffer (enthält 0,05% Proclin), 1 Fläschchen, 30ml
- Antikörper zur Detektion humaner Zytokine, 1 Fläschchen, 3,2ml
- Streptavidin-Phycoerythrin, 1 Fläschchen, 3,2ml
- Verdünnungsmittel für die Beads, 1 Fläschchen, 3,5ml
- 1 Mischflasche

Zusätzlich benötigtes Reagenz:

- Luminex Hüllfluid

Die Materialien des MILLIPLEX MAP Kit wurden bei 2 – 8 °C aufbewahrt und vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur aufgewärmt. Sobald die Standards und Kontrollen rekonstituiert wurden, wurden die Inhalte unmittelbar in Polypropylen-Phiole überführt.

Die lichtsensiblen Antikörper-Beads wurden zunächst 30 Sekunden beschallt und 1 Minute gevortext. Von jedem Antikörper-Bead wurden 60 µl in die Mischflasche gegeben und auf insgesamt 3,0 ml mithilfe des Verdünnungsmittels für Beads aufgefüllt. Die so gemischten Beads wurden gevortext.

Die beiden Qualitätskontrollen wurden mit 250 µl entionisiertem Wasser rekonstituiert, die Phiole wurden zum Mischen invertiert und nach gut 5 Minuten Ruhe wurden die Kontrollen in entsprechend beschriftete Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen überführt.

Der Waschpuffer wurde gemischt, um alle Salze in Lösung zu bringen. 30 ml des 10x Waschpuffer-Fläschchens wurden mit 270 ml entionisiertem Wasser verdünnt.

Der humane Zytokin-Standard wurde vor der Nutzung mit 250 µl entionisiertem Wasser rekonstituiert, damit eine 10.000 pg/ml Konzentration für die Analysen

entstand. Die Phiolen wurden mehrmals zum Mischen invertiert und für 10 Sekunden gevortext. Nach gut 5 Minuten Ruhe wurde der Standard in ein entsprechend beschriftetes Polypropylen-Röhrchen überführt. Hierauf wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen von 2.000, 400, 80, 16 und 3,2 pg/ml durch die Zugabe von Assay-Puffer hergestellt.

### **3.5.3. Durchführung des Immunoassays**

Die Filterplatte wurde mit 200 µl Assay-Puffer je Bohrloch der Mikrotiter Filterplatte befeuchtet, verschlossen, für 10 Minuten gerüttelt und danach mittels Vakuum der Assay-Puffer wieder entfernt. Hierauf wurden in die entsprechenden Wells zunächst 25 µl jeder Standardreihe (der Assay-Puffer wurde für 0 pg/ml verwendet) bzw. der Kontrollen und hierauf 25 µl Matrixlösung in die entsprechenden Wells pipettiert. In die Wells der Proben wurden der Reihe nach 25 µl des Assay-Puffers, 25 µl der Matrixlösung und 25 µl der Probe pipettiert. Im Weiteren wurde bei alle Wells dasselbe Procedere angewendet und 25 µg der gut geschüttelten Beads hinzugefügt. Die Platte wurde anschließend lichtdicht verschlossen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde danach mittels Vakuum entfernt und die Wells zweimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gesäubert. In jeden Well wurden 25 µl Antikörper zur Detektion pipettiert, die Platte erneut lichtdicht verschlossen und 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Hierauf wurden jeweils 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin hinzugegeben und nach erneutem lichtdichtem Verschluss weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde wieder mittels Vakuum entfernt und die Wells zweimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gesäubert. Danach wurde jeweils 150 µl Hüllfluid hinzugegeben und nach 5 Minuten die Platte mittels Luminex ausgewertet.

### **3.5.4. Auswertung der mittels Multiplex-Luminex Technik bestimmten Chemokine**

Die Auswertung der Daten der mittleren Intensität der Fluoreszenzen (Median Fluorescent Intensity) erfolgte nach Herstellerempfehlung mittels gewichteter 5-

Parameter-Logistik. Aus den Messreihen der Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt.

### **3.5.5. Charakteristika des Assays**

Als Charakteristika der Assays lagen folgende Herstellerangaben vor. Die Sensitivität (minimale detektierbare Konzentrationen in pg/ml) betrugen für IL-8 0,2, MCP-1 0,9, MIP-1 $\alpha$  3,5, MIP-1 $\beta$  4,5 und RANTES 1,0. Die Präzision betrug innerhalb eines Assays in %CV für IL-8 7,1, MCP-1 6,1, MIP-1 $\alpha$  5,7, MIP-1 $\beta$  5,3 und RANTES 6,2 und zwischen verschiedenen Assays für IL-8 11,6, MCP-1 12,0, MIP-1 $\alpha$  14,4, MIP-1 $\beta$  10,6 und RANTES 15,7. Die Genauigkeit der Wiederfindungseffizienz in 6 Levels von dotierten Standards in 8 unabhängigen Tests betrug in % für IL-8 101,9, MCP-1 100,7, MIP-1 $\alpha$  102,8, MIP-1 $\beta$  99,3 und RANTES 89,5.

### **3.6. Statistik**

Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurde getestet, ob eine Normalverteilung mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegt. Für Parameter, die nicht normal verteilt waren, wurde der Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich von Mittelwerten  $\pm$  SEM („standard error of the mean“) herangezogen. Bei Werten, die einer Gaußschen Verteilung folgten, wurde der Student's t-test angewandt. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert. Der bivariate Korrelationsanalysentest (Pearson's test) diente für Korrelationsanalysen. Korrelationen zwischen verschiedenen Werten wurden mittels Regressionsanalysen mit Berechnung von  $r$  &  $r^2$  durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

Im Folgenden soll eine Charakterisierung der Studienkohorte und Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse der Multiplex-Luminex-basierten Detektion der verschiedenen Chemokine und nachfolgender Subgruppenanalysen dargestellt werden.

#### 4.1. Charakterisierung der Studienkohorte

Die Datenerhebung zu den eingesandten Proben aus Bonn und Jena war bezüglich der für diese Studie erhobenen Parameter teilweise unvollständig.

Studienkohorte	Häufigkeit numerisch und in %
Gesamtzahl Teilnehmer	214
Anzahl Proben	265
Männer	151 (70,6 %)
Frauen	63 (29,4 %)
BMI kg/m <sup>2</sup> (Mittelwert $\pm$ SEM)	26,8 $\pm$ 6,0 (range 18 – 47)
Alter in Jahre (Mittelwert $\pm$ SEM)	58,8 $\pm$ 10,83 (range 26 – 101)
Leberzirrhose	161 (75,2 %)
MELD-Score (Mittelwert $\pm$ SEM)	19,2 $\pm$ 7,3 (range 6 – 40)
Leberzirrhose Child-Pugh A	5 (3,1 %)
Leberzirrhose Child-Pugh B	57 (35,4 %)
Leberzirrhose Child-Pugh C	99 (61,5 %)
Keine dokumentierte Leberzirrhose	53 (24,8 %)
<i>Ursache der Leberzirrhose:</i>	
Alkohol	96 (59,6 %)
Chronische Hepatitis B/C	25 (15,6 %)
Andere	10 (6,2 %)
Unbekannt	30 (18,6 %)
<i>Ursache des Aszites:</i>	
Portale Hypertension	161 (75,2 %)
Maligne	2 (0,9 %)
Kardial	36 (16,8 %)
Andere / unbekannt	15 (7,0 %)
Hepatozelluläres Karzinom	27 (12,6 %)
Kein hepatozelluläres Karzinom	187 (87,4 %)
Peritonitis	25 (9,4 %)
Keine Peritonitis	240 (90,6 %)

Tab. 5: Charakterisierung der Studienkohorte

#### **4.1.1. Vorhandensein oder Abwesenheit einer Leberzirrhose, Child-Pugh-Score und MELD-Score**

Es wurde bei 161 (75,2 %) Patienten eine Leberzirrhose detektiert, 53 (24,8 %) Patienten wiesen keine dokumentierte Leberzirrhose auf; da die Daten teils unvollständig waren. Epidemiologische Daten zeigen, dass 50% der Patienten mit Leberzirrhose nach erstmaliger Entwicklung eines Aszites binnen zwei Jahren versterben (126). Dementsprechend wies das Patientenkollektiv der Studie insgesamt auch hohe Werte beim Child-Pugh-Score sowie MELD-Score auf. Bei 99 (61,5 %) Patienten errechnete sich ein Child-Pugh-Klasse C, bei 57 (35,4 %) Patienten ein Child-Pugh-Klasse B und lediglich bei 5 (3,1 %) Patienten ein Child-Pugh-Klasse A. Der mittlere MELD-Score betrug  $19,2 \pm 7,3$  (Spannweite 6 - 40).

#### **4.1.2. Ätiologie der Leberzirrhose**

Als Ursache der Leberzirrhose ließ sich bei 96 Patienten (59,6 %) Alkohol, bei 25 Patienten (15,6 %) eine Hepatitis und bei lediglich 10 Patienten (6,2 %) eine andere Ursachen eruieren. Bei 30 Patienten (18,6 %) ließ sich die Ursache nicht ausfindig machen.

#### **4.1.3. Ätiologie des Aszites**

Bezüglich der Ätiologie des Aszites konnten die Proben aus Bonn und Jena nicht vollständig ausgewertet werden. Bei 161 Patienten (75,2 %) konnte als Ursache des Aszites eine portale Hypertension verifiziert werden. Bei 2 Patienten (0,9 %) konnten maligne Zellen nachgewiesen werden. Bei 36 (16,8%) Patienten konnte eine kardiale Ursache angenommen werden. Auf Grund der fehlenden Bestimmung der Serumamylase war eine Zuordnung zu einer pankreatogenen Ursache nicht möglich.

#### **4.1.4. Vorhandensein oder Abwesenheit eines hepatozellulären Karzinoms**

Bei 27 Patienten (12,6 %) lag ein hepatozelluläres Karzinom vor. Maligne Zellen im Aszites konnten bei 2 Patienten nachgewiesen werden: bei einem Patienten mit bekannten HCC und bei einem Patienten ohne bekanntes Tumorleiden.

#### **4.1.5. Vorhandensein oder Abwesenheit einer Peritonitis**

Bei 25 der 265 Proben (9,4 %) lag eine Peritonitis vor, welche durch einen mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis und/oder einen neutrophilen Granulozytenwert  $>250/\mu\text{l}$  im Aszites definiert wurde. Die Patienten wurden in drei Gruppen unterteilt: Bakteraszites, kultur-negative SBP und kultur-positive SBP. 7 Patienten hatten einen Bakteraszites, welcher als positiver mikrobiologischer bakterieller Kulturnachweis bei einem Granulozytenwert  $<250/\mu\text{l}$  definiert war. 11 Patienten hatten eine kulturnegative SBP oder sog. neutrozytischen Aszites, d.h. einen Granulozytenwert  $>250/\mu\text{l}$  im Aszites bei negativem mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis. Bei 7 Patienten konnte eine kulturpositive SBP nachgewiesen werden: bei ihnen lagen gleichzeitig sowohl ein positiver mikrobiologischer bakterieller Kulturnachweis als auch eine Anzahl neutrophiler Granulozyten  $>250/\mu\text{l}$  im Aszites vor.

### **4.2. Chemokine**

Im Folgenden soll eine Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse der Multiplex-Luminex-basierten Detektion der verschiedenen Chemokine und nachfolgender Subgruppenanalysen dargestellt werden.

#### **4.2.1. Detektion der Chemokine**

Eotaxin war in 116 Aszitesproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen im Aszites betrug  $533,6 \pm 2612,7$  pg/ml mit einer Spanne von - 4010,1 – 16233,0 pg/ml. IL-8 war in 103 Aszitesproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen im Aszites betrug  $206,9 \pm 606,6$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 5031,44 pg/ml. MCP-1 war in 116 Aszitesproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen im Aszites betrug  $160,8 \pm 215,1$  pg/ml mit

einer Spanne von 0 – 1582,0 pg/ml. MIP-1 $\alpha$  war in 221 Aszitesproben und 216 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $39,2 \pm 167,6$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 1975,8 pg/ml sowie im Serum  $8,6 \pm 22,0$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 295,1 pg/ml. MIP-1 $\beta$  war in 221 Aszitesproben und 216 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $48,4 \pm 139,7$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 1079,1 pg/ml sowie im Serum  $36,9 \pm 42,1$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 232,4 pg/ml. RANTES war in 116 Aszitesproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen im Aszites betrug  $20,2 \pm 109,2$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 845,3 pg/ml.

#### **4.2.2. Signifikante Konzentrationserhöhungen der Chemokine in den Subgruppenanalysen**

Die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Aszites war signifikant bei Patienten mit positivem mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis im Vergleich mit Patienten mit kultur-negativem Aszites erhöht ( $p = 0,033$ ). Der Mittelwert betrug bei Patienten ohne Kulturnachweis  $125,9 \pm 519,9$  pg/ml und bei Patienten mit Kulturnachweis  $2565,3 \pm 3468,4$  pg/ml.

Bei den Subgruppenanalysen zeigten sich signifikant erhöhte Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  in peritonealer Flüssigkeit bei Patienten mit kultur-positiver SBP gegenüber Patienten mit kultur-negativer SBP ( $p = 0,045$ ). Des Weiteren ergaben sich signifikante Unterschiede im Vergleich von Patienten mit negativem Bakterienwachstum nach 48 Stunden und Granulozyten  $< 250/\mu\text{l}$  im Aszites einerseits mit Patienten mit kultur-positiver SBP ( $p = 0,047$ ) und andererseits mit Patienten mit Bakteraszites und/oder SBP ( $p = 0,031$ ).

Bei 10 Proben lag eine kultur-negative SBP vor; der Mittelwert von MIP-1 $\beta$  betrug  $32,6 \pm 50,1$  pg/ml. Eine kultur-positive SBP lag bei 5 Proben vor; hier betrug der Mittelwert von MIP-1 $\beta$   $538,3 \pm 392,1$  pg/ml. 125 Proben zeigten kein Bakterienwachstum nach 48 Stunden bei gleichzeitiger Granulozytenzahl  $< 250/\mu\text{l}$  im Aszites; der Mittelwert von MIP-1 $\beta$  betrug  $39,6 \pm 103,1$  pg/ml. Ein positives Bakterienwachstum und/oder Granulozytenzahl  $\geq 250/\mu\text{l}$  im Aszites

lag bei 23 Proben vor; der Mittelwert von MIP-1 $\beta$  betrug hierbei  $197,9 \pm 326,6$  pg/ml. (siehe Abbildung 5)

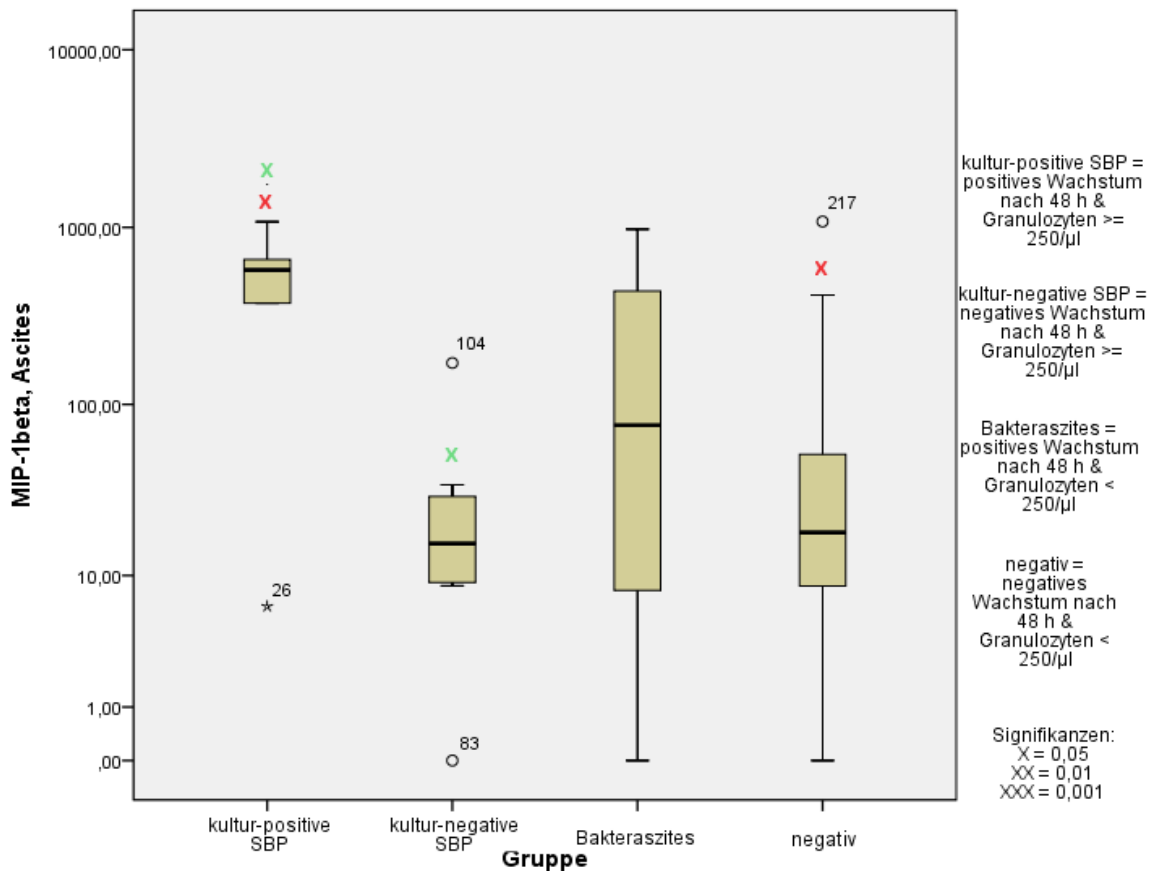


Abb. 5: Boxplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Subgruppenanalyse von MIP-1 $\beta$  im Aszites: die sich signifikant unterscheidenden Konzentrationen wurden jeweils farbig oberhalb der Boxplots unter Angabe der Signifikanz (x) markiert.

Grüne Markierung: signifikant erhöhte Konzentration von MIP-1 $\beta$  im Aszites bei Patienten mit kultur-positiver SBP im Vergleich mit Patienten mit kultur-negativer SBP

Rote Markierung: signifikant erhöhte Konzentration von MIP-1 $\beta$  im Aszites bei Patienten mit kultur-positiver SBP im Vergleich mit Patienten mit negativem Bakterienwachstum nach 48 Stunden und Granulozyten  $< 250/\mu\text{l}$  im Aszites („negativ“)

Im Vergleich der vorbeschriebenen Subgruppen mit Patienten mit Bakteraszites, sowie zwischen Patienten mit Leberzirrhose mit Child-Stadium A und C ergaben sich keine weiteren Signifikanzen.



Es konnte jedoch eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Aszites durch Regressionsanalysen nachgewiesen werden ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,434$ ) (siehe Abbildung 6).

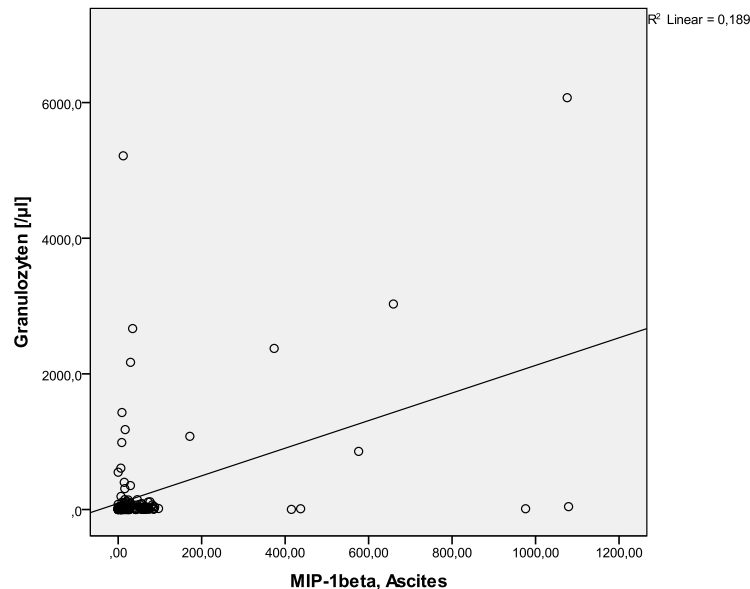


Abb. 6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und der Granulozytenzahl im Aszites

In den Subgruppenanalysen der übrigen bestimmten Chemokine zeigten sich weder Signifikanzen im Vergleich von Patienten mit kultur-positiver SBP, kultur-negativer SBP, Bakteraszites, negativem Bakterienwachstum nach 48 Stunden und Granulozyten  $< 250/\mu\text{l}$  noch im Vergleich zwischen Patienten mit Leberzirrhose mit Child-Stadium A und C. Bei keinem der weiteren Chemokine konnte eine positive Korrelation zwischen der Konzentration und der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Aszites nachgewiesen werden.

#### 4.2.3. Korrelation der Chemokine in Aszites und Serum

Alle zuvor genannten Chemokine wurden im Aszites bestimmt. Aufgrund nicht ausreichend verfügbarer Proben konnten lediglich MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  zusätzlich im Serum gemessen werden. Die folgenden Tabellen zeigen die Korrelationen der Chemokine untereinander.

#### 4. Ergebnisse

Korrelation im Aszites	Eotaxin	IL-8	MCP-1	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	RANTES
Eotaxin	-	xxx	xxx			xxx
IL8	xxx	-	xxx		x	
MCP-1	xxx	xxx	-			xxx
MIP-1 $\alpha$				-	xxx	
MIP-1 $\beta$		x		xxx	-	
RANTES	xxx		xxx			-

Tab. 6: Korrelation der Chemokine im Aszites. Legende: xxx bei  $p < 0,001$ ; xx bei  $p < 0,01$ ; x bei  $p < 0,05$ ; - nicht bestimmt

Korrelation im Serum	Eotaxin	IL-8	MCP-1	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	RANTES
Eotaxin	-	-	-	-	-	-
IL8	-	-	-	-	-	-
MCP-1	-	-	-	-	-	-
MIP-1 $\alpha$	-	-	-	-	xx	-
MIP-1 $\beta$	-	-	-	xx	-	-
RANTES	-	-	-	-	-	-

Tab. 7: Korrelation der Chemokine im Serum. Legende: xxx bei  $p < 0,001$ ; xx bei  $p < 0,01$ ; x bei  $p < 0,05$ ; - nicht bestimmt

Korrelation zw. Aszites und Serum	Eotaxin	IL-8	MCP-1	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	RANTES
Eotaxin	-	-	-	-	-	-
IL8	-	-	-	-	-	-
MCP-1	-	-	-	-	-	-
MIP-1 $\alpha$	-	-	-	-	x	-
MIP-1 $\beta$	-	-	-	x	-	-
RANTES	-	-	-	-	-	-

Tab. 8: Korrelation der Chemokine in Aszites und Serum. Legende: xxx bei  $p < 0,001$ ; xx bei  $p < 0,01$ ; x bei  $p < 0,05$ ; - nicht bestimmt

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von Eotaxin und IL-8 im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,419$ ) (siehe Abbildung 7).

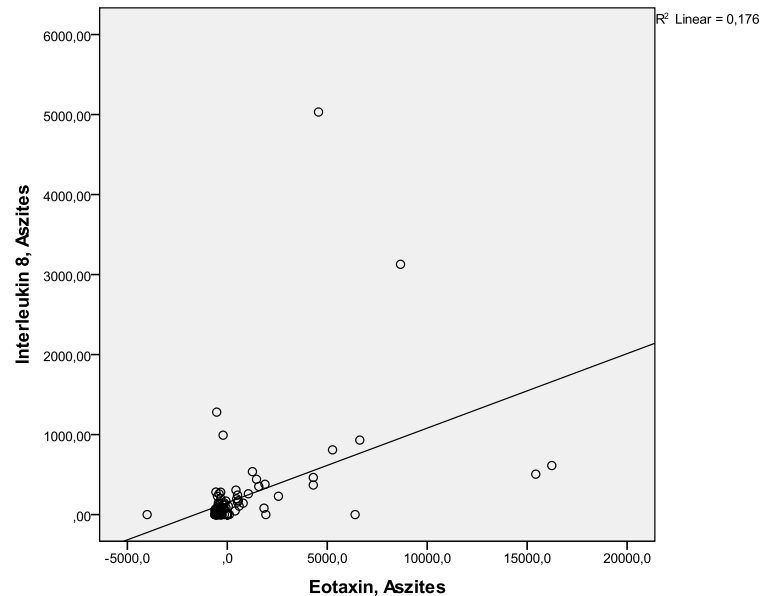


Abb. 7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen Eotaxin und IL-8 im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von Eotaxin und MCP-1 im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,606$ ) (siehe Abbildung 8).

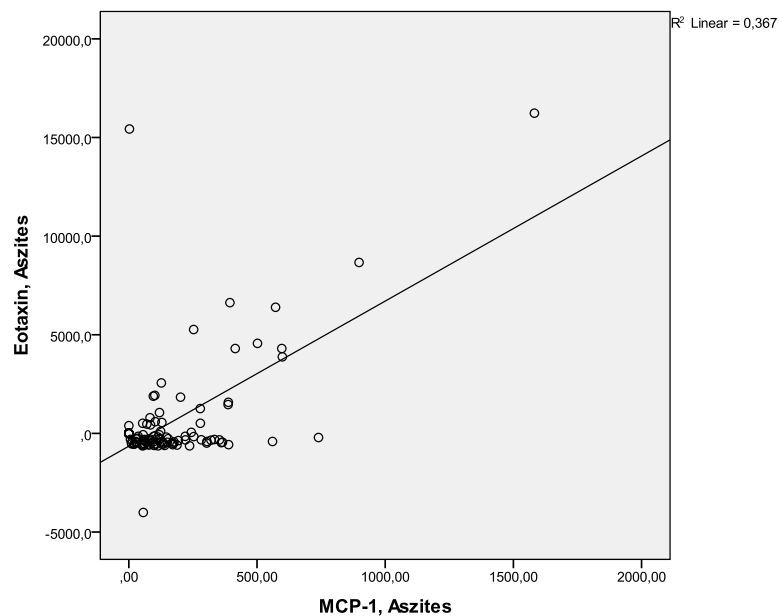


Abb. 8: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen Eotaxin und MCP-1 im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von Eotaxin und RANTES im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,844$ ) (siehe Abbildung 9).

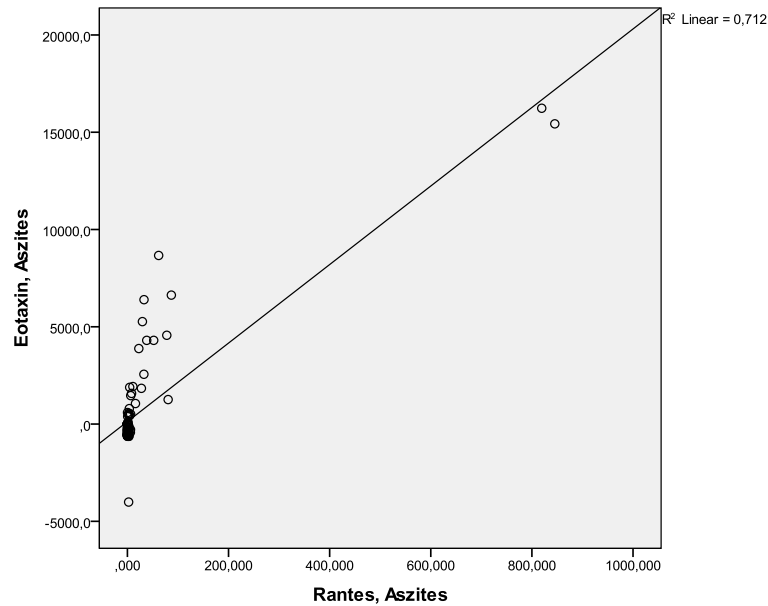


Abb. 9: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen Eotaxin und RANTES im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von IL-8 und MCP-1 im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,448$ ) (siehe Abbildung 10).

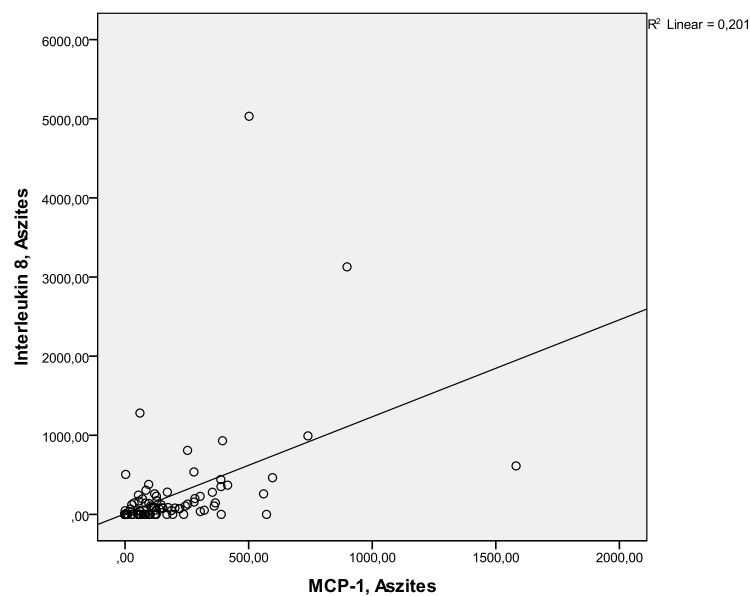


Abb. 10: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-8 und MCP-1 im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von IL-8 und MIP-1 $\beta$  im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,035$ ,  $R = 0,208$ ) (siehe Abbildung 11).

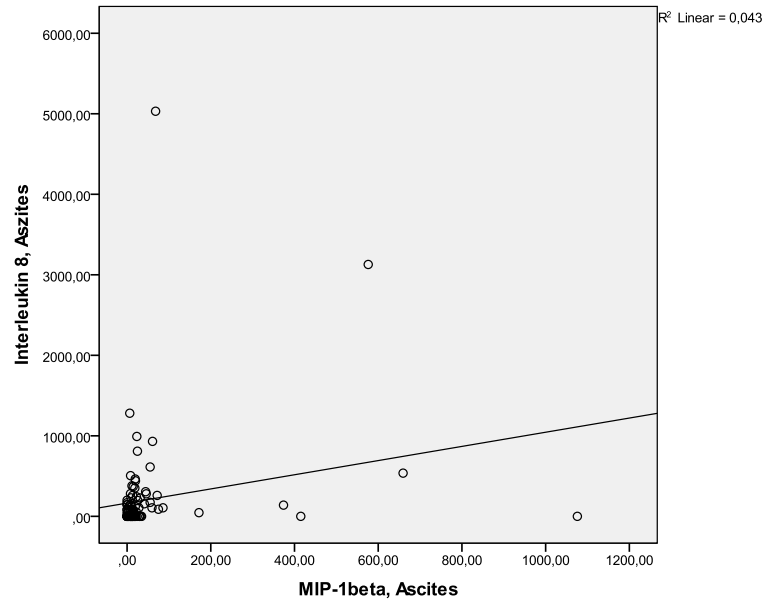


Abb. 11: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-8 und MIP-1 $\beta$  im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MCP-1 und RANTES im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,441$ ) (siehe Abbildung 12).

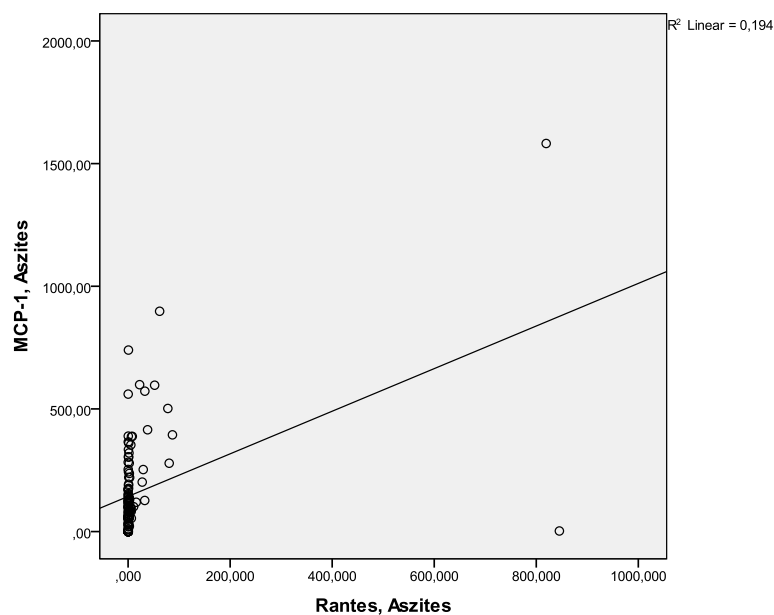


Abb. 12: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MCP-1 und RANTES im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,802$ ) (siehe Abbildung 13).

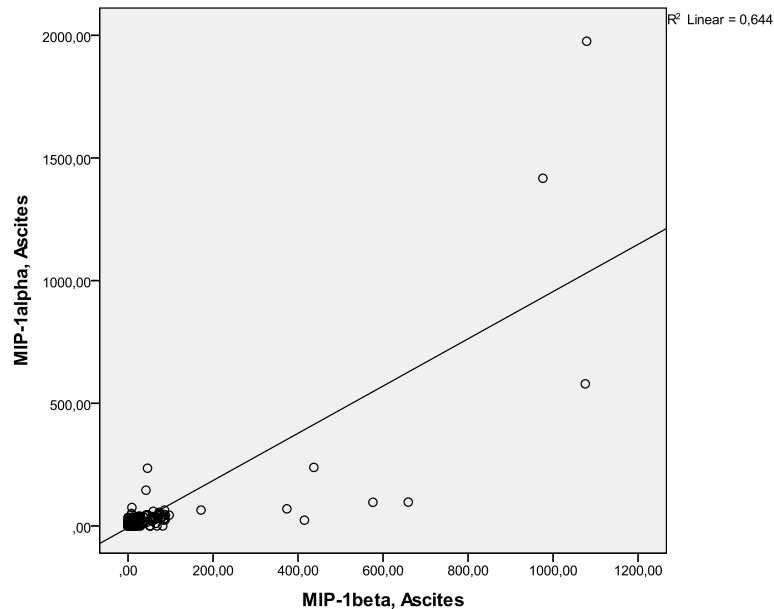


Abb. 13: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,002$ ,  $R = 0,214$ ) (siehe Abbildung 14).

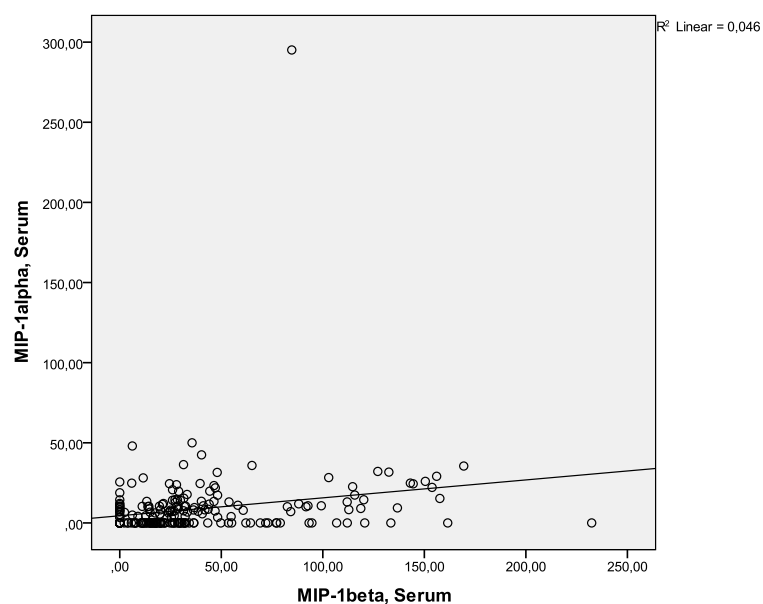


Abb. 14: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\alpha$  in Aszites und Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,033$ ,  $R = 0,146$ ) (siehe Abbildung 15).

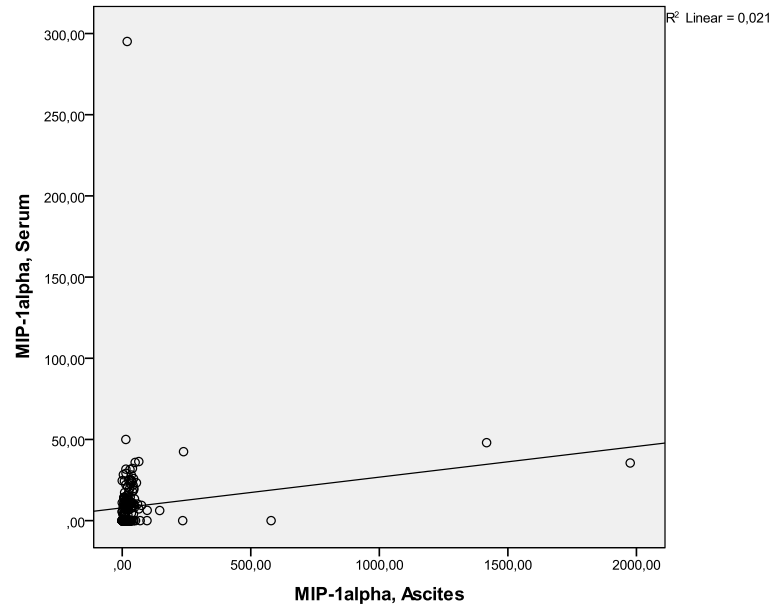


Abb. 15: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  in Aszites und Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  in Aszites und Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,031$ ,  $R = 0,147$ ) (siehe Abbildung 16).

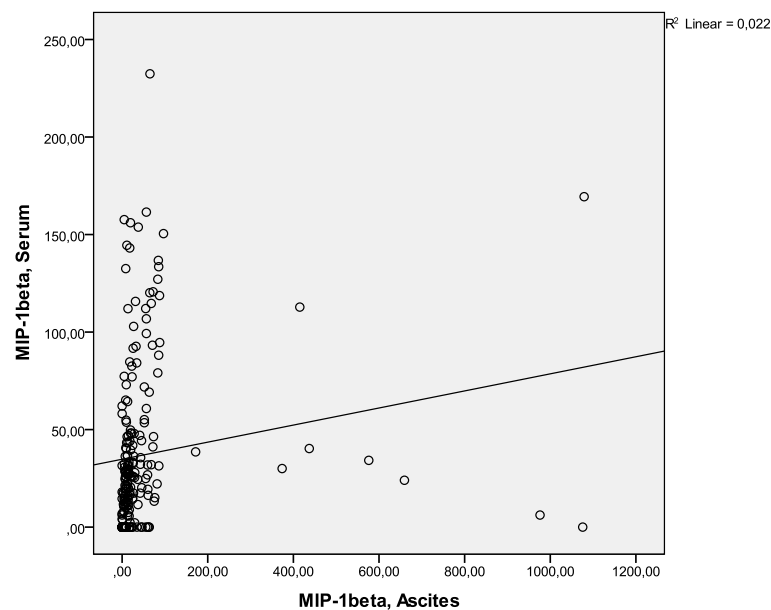


Abb. 16: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  in Aszites und Serum

#### 4.2.4. Detektion weiterer Zytokine in Aszites und Serum und deren Korrelation zu MIP-1 $\beta$

MIP-1 $\beta$  zeigte in den bisherigen Ergebnissen die signifikantesten Werte innerhalb der Gruppe der untersuchten Chemokine. Im Rahmen weiterer Studien wurden beim selben Patientenkollektiv weitere Zytokine in Aszites und Serum bestimmt: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A und TNF- $\alpha$ .

IFN- $\gamma$  war in 227 Aszitesproben und 221 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $40,0 \pm 409,1$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 6054,9 pg/ml sowie im Serum  $24,8 \pm 86,6$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 1033,6 pg/ml. IL-1 $\alpha$  war in 227 Aszitesproben und 221 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $28,8 \pm 271,3$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 2941,1 pg/ml sowie im Serum  $16,9 \pm 54,7$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 535,2 pg/ml. IL-1 $\beta$  war in 227 Aszitesproben und 221 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $17,8 \pm 182,9$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 2096,9 pg/ml sowie im Serum  $1,5 \pm 9,9$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 133,6 pg/ml. IL-1RA war in 220 Aszitesproben und 215 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $61,9 \pm 583,6$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 7895,2 pg/ml sowie im Serum  $1,5 \pm 9,9$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 605,2 pg/ml. IL-4 war in 219 Aszitesproben und 215 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $14,1 \pm 134,8$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 1958,0 pg/ml sowie im Serum  $16,5 \pm 55,4$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 395,4 pg/ml. IL-6 war in 209 Aszitesproben und 215 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $3570,2 \pm 2675,1$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 10000,0 pg/ml sowie im Serum  $152,6 \pm 734,4$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 7905,2 pg/ml. IL-10 war in 227 Aszitesproben und 221 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $216,8 \pm 560,0$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 7404,4 pg/ml sowie im Serum  $8,5 \pm 22,6$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 175,1 pg/ml. IL-17A war in 227 Aszitesproben und 221 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $8,1 \pm 22,3$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 146,5 pg/ml sowie im



Serum  $22,9 \pm 48,9$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 322,68 pg/ml. TNF- $\alpha$  war in 221 Aszitesproben und 216 Serumproben detektierbar. Der Mittelwert der Konzentrationen betrug im Aszites  $25,0 \pm 84,0$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 1037,9 pg/ml sowie im Serum  $15,4 \pm 14,0$  pg/ml mit einer Spanne von 0 – 92,6 pg/ml.

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht über die Korrelationen zu MIP-1 $\beta$ .

Korrelation zu MIP-1 $\beta$	IFN- $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1RA	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	TNF- $\alpha$
Im Aszites	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx
Im Serum	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx		xx	xxx	xxx

Tab. 9: Korrelation von MIP-1 $\beta$  zu weiteren Zytokinen in Aszites und Serum. Legende: xxx bei  $p < 0,001$ ; xx bei  $p < 0,01$ ; x bei  $p < 0,05$ ; - nicht bestimmt

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,244$ ) (siehe Abbildung 17).

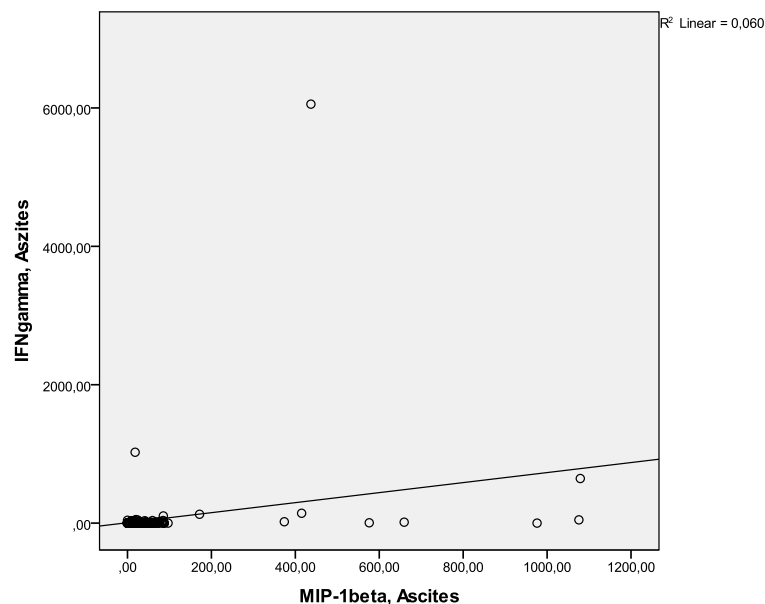


Abb. 17: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,488$ ) (siehe Abbildung 18).

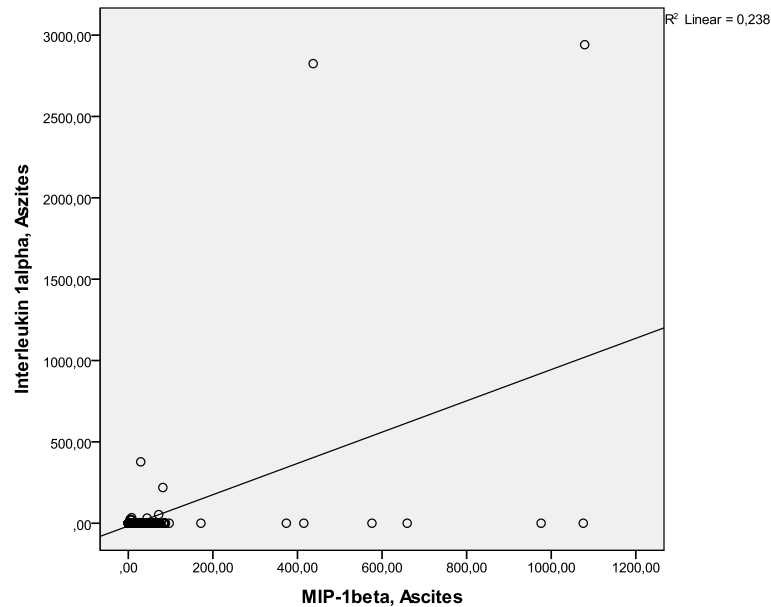


Abb. 18: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,00$ ,  $R = 0,478$ ) (siehe Abbildung 19).

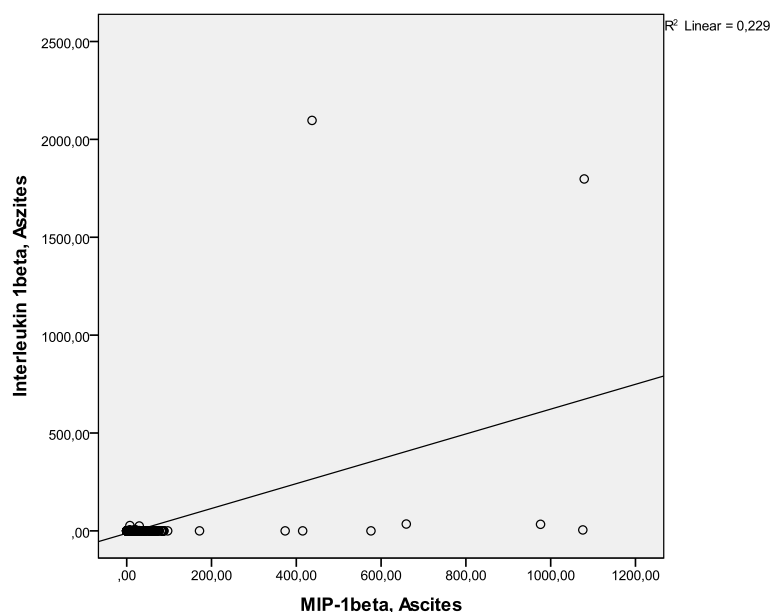


Abb. 19: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-1RA im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,629$ ) (siehe Abbildung 20).

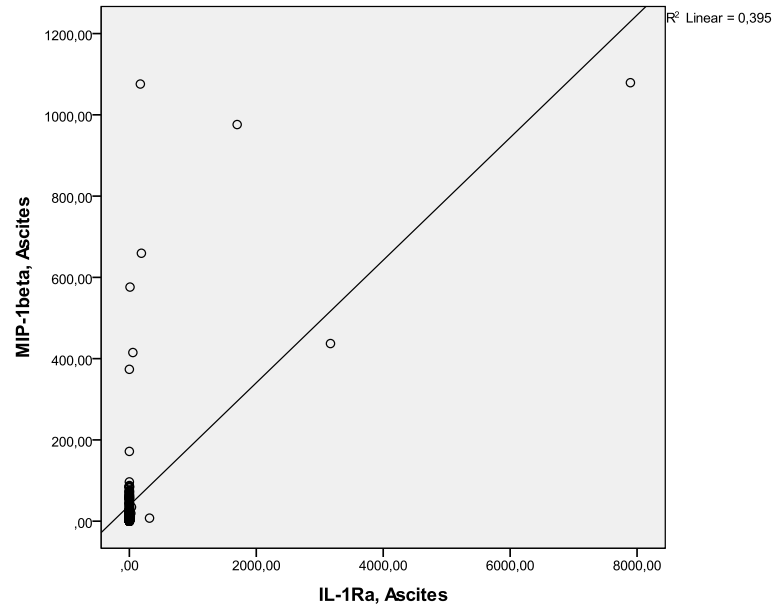


Abb. 20: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1RA im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-4 im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,01$ ,  $R = 0,222$ ) (siehe Abbildung 21).

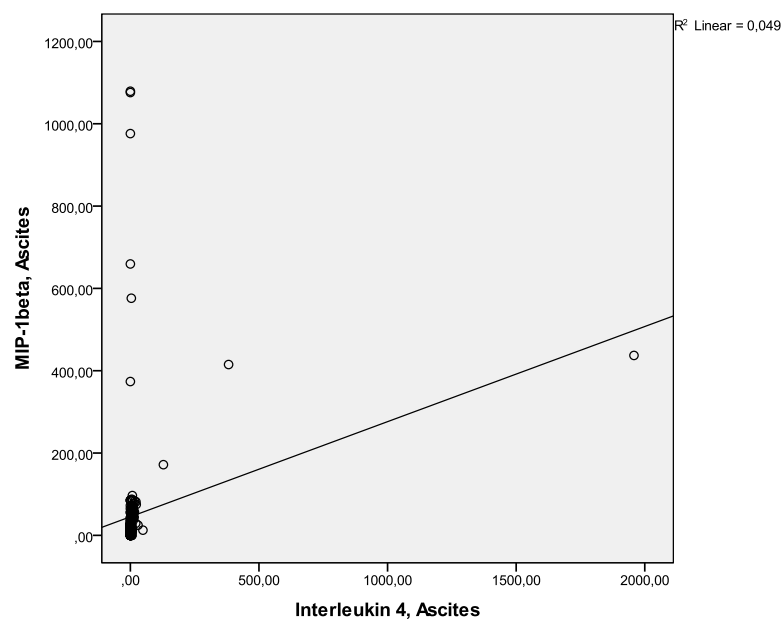


Abb. 21: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-4 im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-6 im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,254$ ) (siehe Abbildung 22).

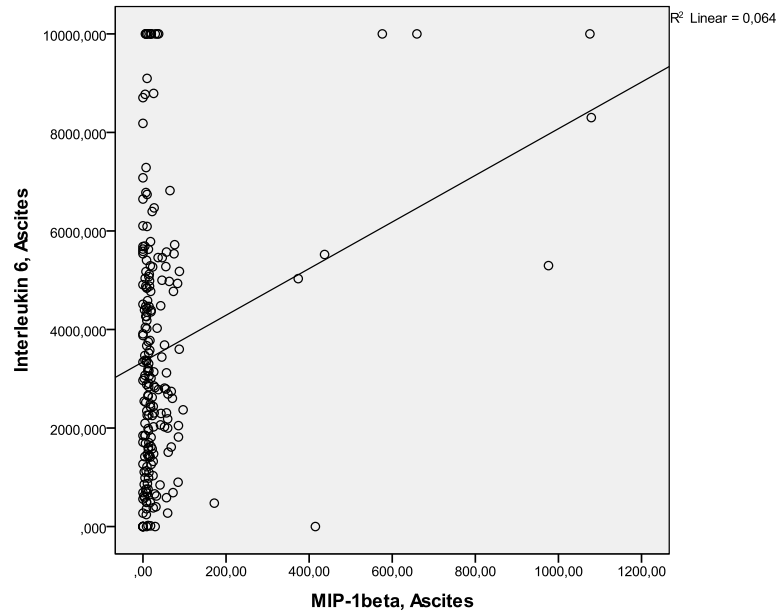


Abb. 22: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-6 im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-10 im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,477$ ) (siehe Abbildung 23).

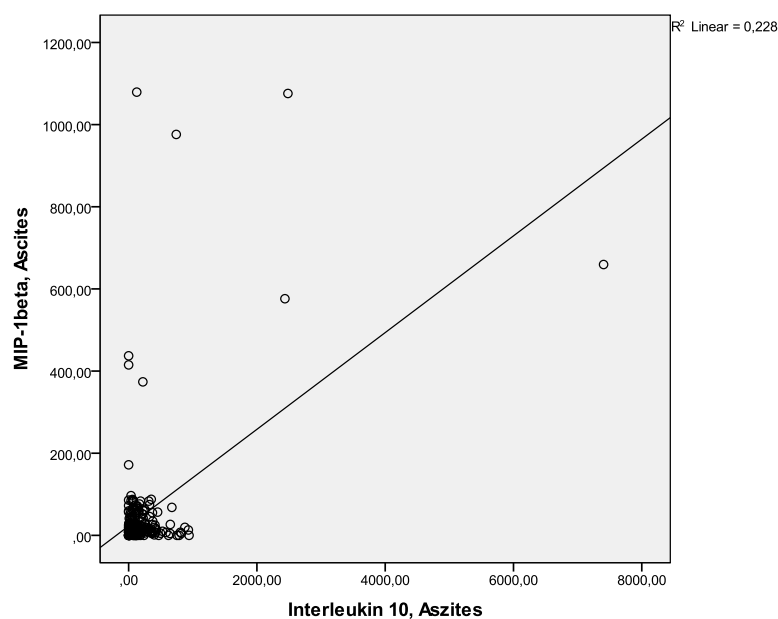


Abb. 23: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-10 im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-17A im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,332$ ) (siehe Abbildung 24).

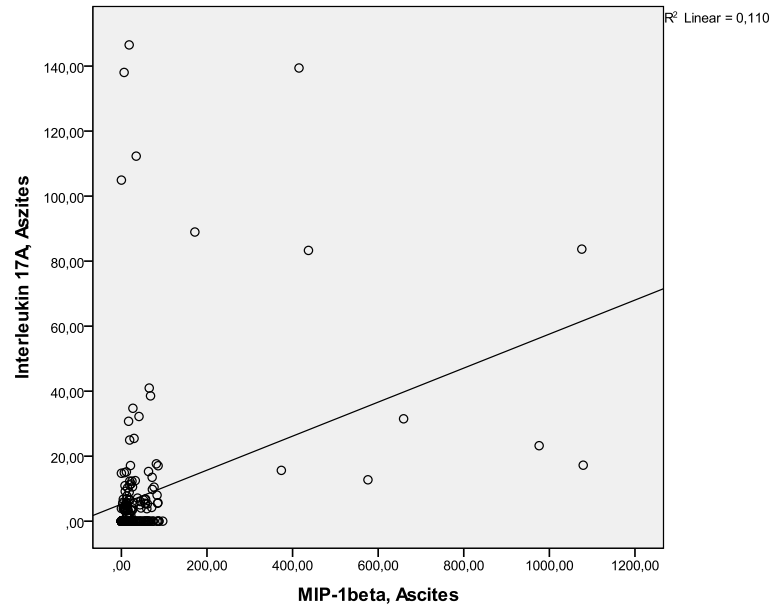


Abb. 24: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-17A im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,767$ ) (siehe Abbildung 25).

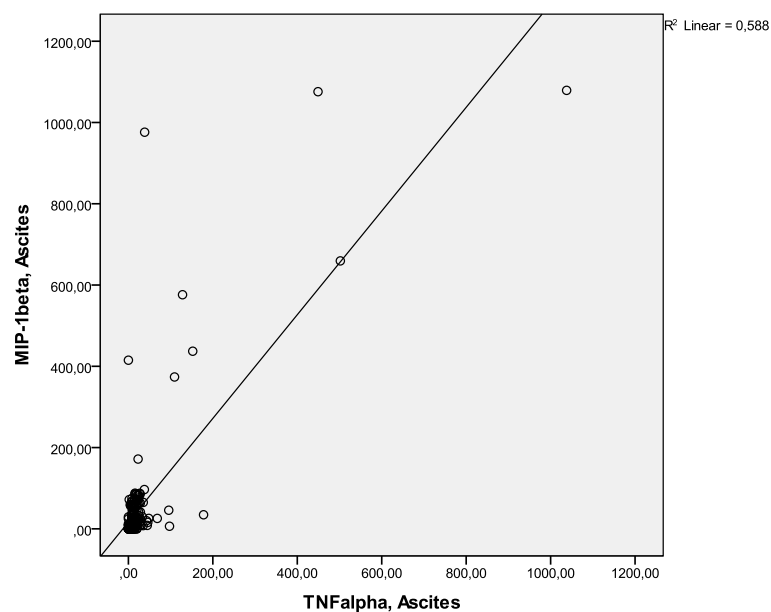


Abb. 25: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,257$ ) (siehe Abbildung 26).

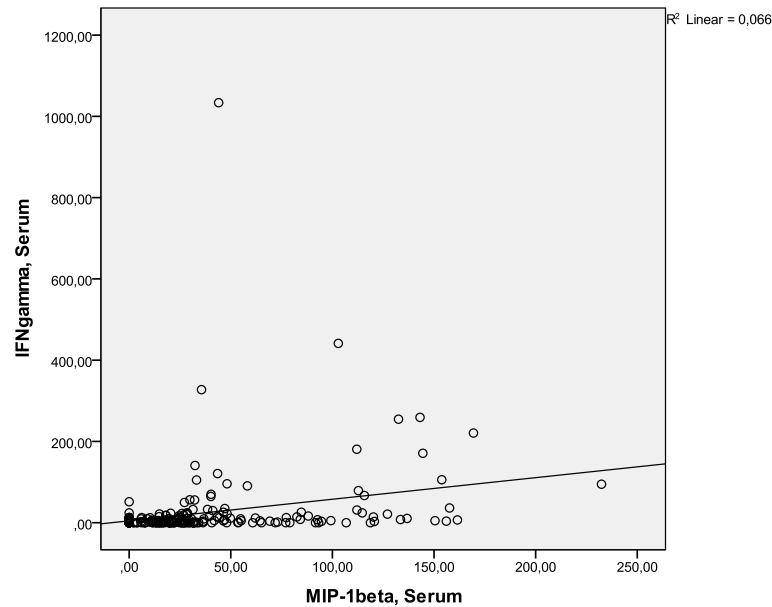


Abb. 26: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,355$ ) (siehe Abbildung 27)

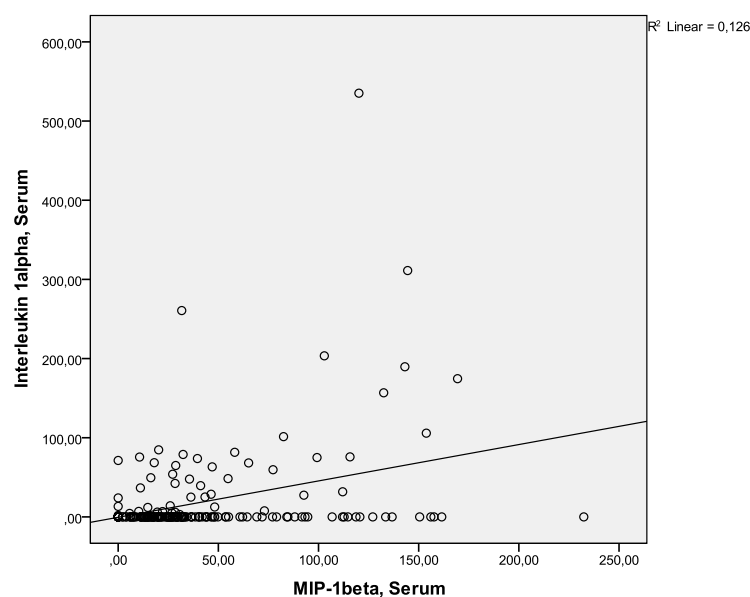


Abb. 27: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,397$ ) (siehe Abbildung 28).

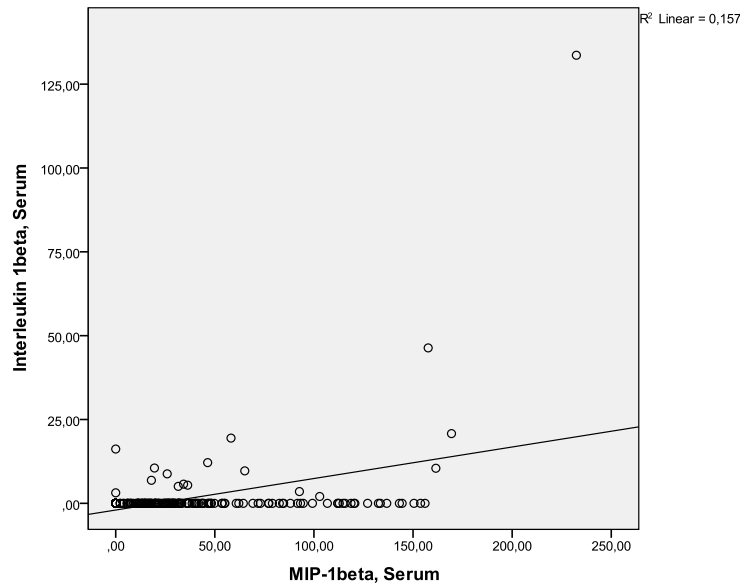


Abb. 28: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-1RA im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,370$ ) (siehe Abbildung 29).

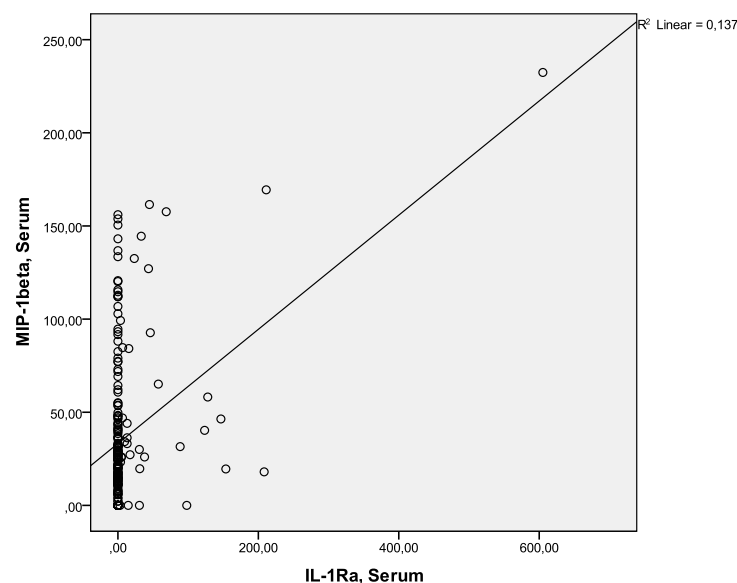


Abb. 29: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1RA im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-4 im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,530$ ) (siehe Abbildung 30).

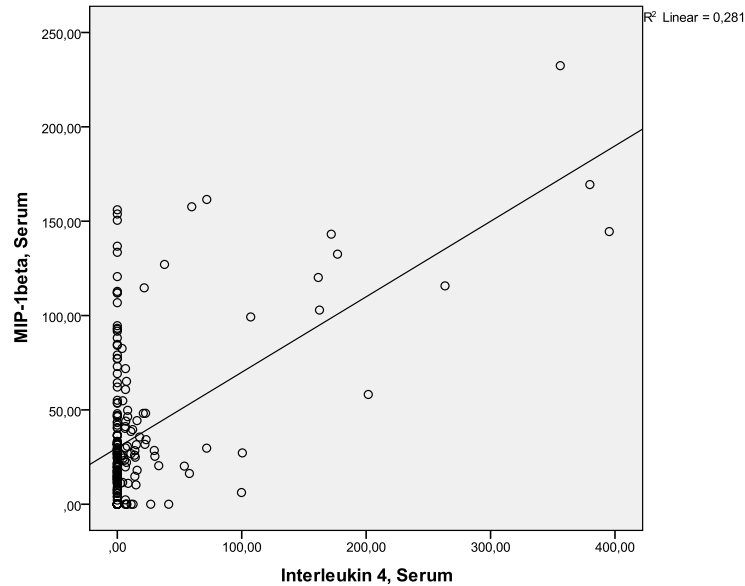


Abb. 30: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-4 im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-10 im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,001$ ,  $R = 0,225$ ) (siehe Abbildung 31).

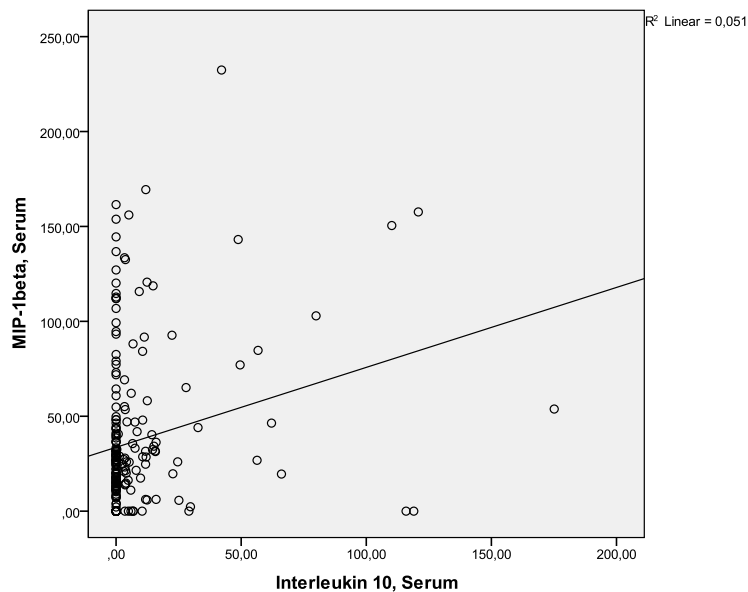


Abb. 31: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-10 im Serum



Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und IL-17A im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,394$ ) (siehe Abbildung 32).

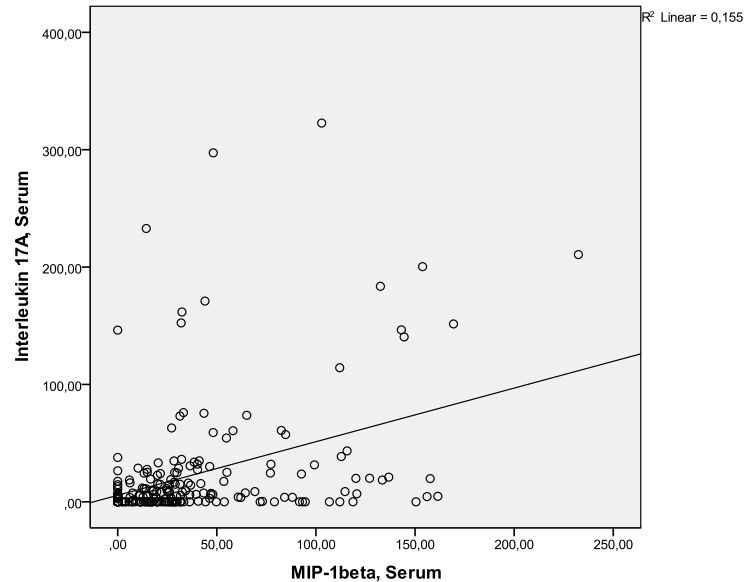


Abb. 32: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-17A im Serum

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Serum wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,381$ ) (siehe Abbildung 33).

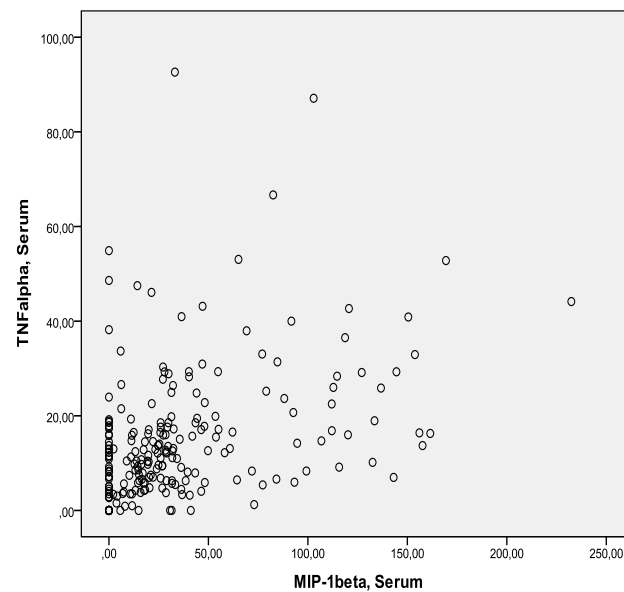


Abb. 33: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Serum

#### 4.3. Übersicht über die Kernaussagen des Ergebnisteils

- Die Konzentration von MIP-1 $\beta$  in peritonealer Flüssigkeit ist signifikant erhöht bei Patienten mit kultur-positiver SBP im Vergleich einerseits mit Patienten mit kultur-negativer SBP und andererseits mit Patienten mit negativem Bakterienwachstum nach 48 Stunden und Granulozyten < 250/ $\mu$ l im Aszites. Im Vergleich zu letztgenannter Gruppe ist die Konzentration von MIP-1 $\beta$  im Aszites auch bei Patienten mit Bakteraszites und/oder SBP signifikant erhöht.
- Für alle anderen untersuchten Chemokine fand sich keine signifikante Veränderung der Konzentration in peritonealer Flüssigkeit in Abhängigkeit vom Vorliegen einer SBP oder Bakteraszites. Ferner fand sich für keines der Chemokine eine signifikante Veränderung in Abhängigkeit vom Schweregrad der Leberzirrhose.
- Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen den Aszites- und Serumkonzentrationen von MIP-1 $\beta$  – aber auch MIP-1 $\alpha$ . Ferner fand sich die MIP-1 $\beta$  Konzentration im Serum signifikant positiv korreliert mit der von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie im Aszites mit der von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und der Anzahl neutrophiler Granulozyten.
- In peritonealer Flüssigkeit sind die Konzentrationen von Eotaxin, IL-8, MCP-1 und RANTES - außer zwischen IL-8 und RANTES - positiv korreliert.

#### 5. Diskussion

Die Expression von Chemokinen war Forschungsthema breitgefächelter Studien insbesondere im Zusammenhang mit entzündlichen Reaktionen. Die Chemokinexpression in peritonealer Flüssigkeit bei SBP war bisher jedoch nur Gegenstand weniger Untersuchungen.

In einer 2001 von Giron-Gonzalez et al. veröffentlichten Studie wurden die Konzentrationen von Chemokinen (IL-8, growth-regulated oncogene (Gro- $\alpha$ ), und MCP-1) sowie von löslichen Adhäsionsmolekülen (P-selectin, E-selectin, L-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion

molecule-1 (VCAM-1) bei Patienten mit spontan bakterieller Peritonitis in Serum und Aszites untersucht (47). Die Präparate wurden seriell mittels ELISA bei Patienten mit SBP im Vergleich zu nicht infizierten Zirrhosepatienten und einer gesunden Kontrollgruppe analysiert. Zirrhosepatienten per se (ob mit oder ohne SBP) zeigten signifikant erhöhte Serumkonzentrationen der Adhäsionsmoleküle. Die SBP war zudem mit signifikant erhöhten Serum- und Asziteskonzentrationen von IL-8, Gro- $\alpha$  und ICAM-1 sowie Asziteskonzentrationen von MCP-1 assoziiert. Zusätzlich korrelierte die Konzentration von IL-8 signifikant mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten (PMN) im Aszites. Signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von ICAM-1 und VCAM-1 wurden bei Patienten detektiert, welche die SBP nicht überlebten. Hieraus wurde gefolgert, dass erhöhte Asziteskonzentrationen von Chemokinen in Zusammenhang mit einer peritonealen Infiltrationen bei Patienten mit einer SBP stehen könnten. Eine prognostische Signifikanz wurde den Serumkonzentrationen von ICAM-1 und VCAM-1 bei diesen Patienten zugeschrieben.

In einer späteren, ähnlich aufgebauten Studie von Qing-Fang Xiong, wurden ebenfalls signifikant erhöhte Serum- und Asziteskonzentrationen von IL-8 und ICAM-1 sowie erhöhte Asziteskonzentrationen von MCP-1 bei Patienten mit SBP im Vergleich mit einer Kontrollgruppe nicht-infizierter Zirrhosepatienten gefunden. Ebenso wurden erhöhte Serumkonzentrationen von ICAM-1 bei Patienten detektiert, welche die SBP nicht überlebten (46).

In einer Studie, welche 2007 von Kim et al. veröffentlicht wurde, wurde die Expression der inflammatorischen Zytokine MCP-1 und IL-10 bei Zirrhosepatienten mittels ELISA untersucht (70). Es wurden signifikant erhöhte Serum- und Asziteskonzentrationen von MCP-1 und IL-10 bei Zirrhosepatienten mit unbehandelter SBP im Vergleich mit Zirrhosepatienten ohne SBP gefunden. Die Konzentrationen fielen im Verlauf der antibiotischen Behandlung der Patienten ab; niedrige Konzentrationen von MCP-1 und IL-10 am 7. Behandlungstag korrelierten dabei positiv und statistisch signifikant mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Hieraus wurde gefolgert, dass die Serum- und Asziteskonzentrationen von MCP-1 und IL-10 in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf einer SBP stehen könnten.

In einer aktuellen Studie, welche 2014 von Lesinska et al. publiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die MIP-1 $\beta$ -Konzentration im Aszites bei SBP signifikant erhöht ist (81). Das Ziel der Studie lag darin, die diagnostische Effizienz der Bestimmung von Procalcitonin (PCT) und MIP-1 $\beta$  in Serum und Aszites bei einer SBP zu evaluieren. Die Patienten wurden anhand der Anzahl der neutrophilen Granulozyten (PMN) im Aszites in zwei Gruppen aufgeteilt: steril (Zellzahl < 250/mm<sup>3</sup>) und SBP (Zellzahl  $\geq$  250/mm<sup>3</sup>). Die Serum- und Asziteskonzentrationen von PCT und MIP-1 $\beta$  korrelierten nicht mit den klinischen und Routinelabor-Parametern. Die Serum- und Asziteskonzentrationen von PCT unterschieden sich nicht bei Patienten mit und ohne SBP. Die Asziteskonzentration von MIP-1 $\beta$  war bei Patienten mit SBP im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Sensitivität und Spezifität der Diagnose einer SBP anhand einer erhöhten MIP-1 $\beta$ -Konzentration im Aszites betrugen 80% bzw. 72,7%, respektive 0,77 in der AUROC-Analyse. Die Serumkonzentration von MIP-1 $\beta$  besaß eine niedrigere diagnostische Aussagekraft als die Asziteskonzentration. Die Schlussfolgerung war dementsprechend, dass die MIP-1 $\beta$ -Konzentration im Aszites künftig mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung von Patienten mit und ohne SBP herangezogen werden könnte.

Zur Expression der Chemokine Eotaxin, MIP-1 $\alpha$  und RANTES in peritonealer Flüssigkeit konnte bisher keine Publikation im Zusammenhang mit einer Peritonitis in der Literatur gefunden werden.

In der vorliegenden Studie wurden die Konzentrationen der Chemokine Eotaxin, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES in peritonealer Flüssigkeit sowie teilweise zusätzlich im Serum mittels Multiplex-Luminex Technik bestimmt und einerseits bei Patienten mit kultur-positiver SBP, kultur-negativer SBP, Bakteraszites, negativem Bakterienwachstum nach 48 Stunden und Granulozyten < 250/ $\mu$ l und andererseits bei Patienten mit Leberzirrhose mit Child-Stadium A und C verglichen.

Die Chemokine IL-8 (n = 103) sowie Eotaxin, MCP-1 und RANTES (jeweils n = 116) wurden im Aszites, die Chemokine MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  wurden in Aszites

(jeweils  $n = 221$ ) und Serum (jeweils  $n = 216$ ) quantifiziert. Eine signifikante Konzentrationserhöhung konnte bei keinem der bestimmten Chemokine in Abhängigkeit vom Schweregrad der Leberzirrhose nachgewiesen werden.

Eine SBP wird durch einen neutrophilen Granulozytenwert („polymorphonuclear neutrophils“ PMN) von  $>250$  Zellen/ $\mu\text{l}$  im Aszites definiert (132). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Aszites signifikant bei Patienten mit positivem mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis im Vergleich mit Patienten mit kultur-negativem Aszites erhöht ist. Des Weiteren besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Aszites, also einer entzündlichen Infiltration, und der Konzentration des Chemokins MIP-1 $\beta$  im Aszites. Dies unterstützt die Thesen, dass die Synthese von MIP-1 $\beta$  durch bakterielle Endotoxine stimuliert wird (76) und MIP-1 $\beta$  für die Aktivierung von PMN mitverantwortlich und somit an der Chemotaxis und akuten neutrophilen Entzündung beteiligt ist (76).

Bei insgesamt 25 der 265 analysierten Proben lag eine Peritonitis vor, welche durch einen mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis und/oder einen neutrophilen Granulozytenwert  $>250/\mu\text{l}$  definiert wurde. Die Konzentration von MIP-1 $\beta$  in peritonealer Flüssigkeit ist signifikant erhöht bei Patienten mit kultur-positiver SBP (Mittelwert  $538,3 \pm 392,1$  pg/ml) im Vergleich einerseits mit Patienten mit kultur-negativer SBP (Mittelwert  $32,6 \pm 50,1$  pg/ml) und andererseits mit Patienten mit negativem Bakterienwachstum nach 48 Stunden und Granulozyten  $< 250/\mu\text{l}$  im Aszites (Mittelwert  $39,6 \pm 103,1$  pg/ml). Im Vergleich zu letztgenannter Gruppe ist die Konzentration von MIP-1 $\beta$  im Aszites auch bei Patienten mit Bakteraszites und/oder SBP (Mittelwert  $197,9 \pm 326,6$  pg/ml) signifikant erhöht. Insgesamt konnte somit die zuvor beschriebene Erkenntnis der Studie von Lesinska et al. (81) bestätigt werden, dass die MIP-1 $\beta$ -Konzentration im Aszites bei Patienten mit SBP im Vergleich mit dem gesunden Kollektiv signifikant erhöht ist.

Die Chemokine Eotaxin, MIP-1 $\alpha$  und RANTES wurden bisher nicht in peritonealer Flüssigkeit bei Peritonitis untersucht. Es lag in dieser Studie eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  einerseits mit IL-8 im Aszites und andererseits mit MIP-1 $\alpha$  in Serum und Aszites vor. In den

Regressionsanalysen zeigten sich allerdings keine signifikanten Erhöhungen der Konzentrationen bei vorliegender SBP.

Zusätzlich lag eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von Eotaxin, IL-8, MCP-1 und RANTES - außer zwischen IL-8 und RANTES - vor; auch bei diesen Chemokinen konnte jedoch keine signifikante Konzentrationserhöhung bei SBP nachgewiesen werden.

MIP-1 $\beta$  zeigte in den bisherigen Ergebnissen die signifikantesten Werte innerhalb der Gruppe der untersuchten Chemokine. Im Rahmen weiterer Studien wurden beim selben Patientenkollektiv weitere Zytokine in Aszites und Serum bestimmt: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Außer der Serumkonzentration von IL-6 waren alle Konzentrationen dieser Zytokine hochsignifikant positiv korreliert mit der Konzentration von MIP-1 $\beta$ .

Ein sog. Zytokinsturm entsteht durch eine sich selbst verstärkende Rückkopplung zwischen Zytokinen und Leukozyten mit Hyperzytokinämie und ist eine potentiell lebensbedrohliche Immunreaktion (136). Die primären Symptome sind hohes Fieber, Schwellung, Rötung, extreme Müdigkeit und Übelkeit. Sowohl erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, als auch antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-1RA werden während eines Zytokinsturms im Serum von Patienten nachgewiesen (137)(138)(139). Wenn das Immunsystem Pathogene bekämpft, signalisieren Zytokine Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen zu einem Entzündungsort zu wandern. Zusätzlich stimulieren Zytokine diese Zellen dazu mehr Zytokine zu produzieren (140). Normalerweise wird diese Rückkopplung durch den Körper kontrolliert. Unter einigen bisher nicht genau bekannten Umständen kann diese Reaktion jedoch unkontrolliert ablaufen, wodurch zu viele Immunzellen an einem Ort aktiviert werden und großer Schaden an Körperwebe und Organen bis hin zum Tod resultieren können. Bei einer Reihe infektiöser und nicht-infektiöser Erkrankungen wie graft versus host disease (GVHD), acute respiratory distress syndrome (ARDS), Sepsis, Vogelgrippe und dem systemic inflammatory response syndrome (SIRS) wurde ein Zytokinsturm beschrieben (141). In dieser Studie konnte somit zusätzlich gezeigt werden, dass die an einem potentiell lebensbedrohlichen Zytokinsturm beteiligten Zytokine korrelierend zur Konzentration von MIP-1 $\beta$  sowohl im Aszites als auch

im Serum erhöht waren. Die Konzentration von MIP-1 $\beta$  selbst war in der Subgruppenanalyse bei Patienten mit SBP und/oder Bakteraszites signifikant erhöht und ist mit der Anzahl der Neutrophilen im Aszites signifikant positiv korreliert.

Inwiefern diese Daten klinisch relevant sind, d.h. prognostisch relevant im Sinne einer Stratifizierung der Zirrhosepatienten mit SBP/Bakteraszites bleibt leider unklar, da keine standardisierte Nachbeobachtung der Patienten und/oder Datenlage zum Überlebensstatus der Patienten vorlag. Weitere Studien wären notwendig, um die Verlässlichkeit und den zeitlichen Rahmen von MIP1- $\beta$  in Bezug auf die Diagnosestellung einer peritonealen Entzündung zu überprüfen. Sollte sich MIP-1 $\beta$  als Marker einer Peritonitis in weiteren Studien bestätigen, so bleibt überdies die spannende Frage, ob anhand von Konzentrationsveränderungen von MIP-1 $\beta$  im Verlauf die Abheilung einer SBP bzw. das Outcome der Patienten beurteilt werden kann. Ein weiteres interessantes Thema für Folgestudien könnte die Untersuchung des Zusammenhangs von MIP-1 $\beta$  mit dem sog. Zytokinsturm sein und welche Rolle dieser bei einer SBP und dem Überleben der Patienten spielt.

## **6. Zusammenfassung**

Die vorliegende klinisch prospektive und experimentelle Arbeit gibt Einblicke in die Rolle der Chemokine in peritonealer Flüssigkeit bei Patienten mit Leberzirrhose und Peritonitis. Im Rahmen einer 2-jährigen (05/09 – 05/11) Sammlung und Charakterisierung eines Patientenkollektivs, insbesondere im Bereich der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I und II des Universitätsklinikums Regensburg, aber ebenso mit freundlicher Unterstützung der Universitätskliniken Bonn und Jena, gelang es 214 Patienten in die Studie aufzunehmen, bei denen insgesamt 265 Parazentese durchgeföhrt wurden. Die Chemokine Eotaxin, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES wurden in peritonealer Flüssigkeit sowie MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  zusätzlich im Serum bestimmt. Eine signifikante Konzentrationserhöhung konnte bei keinem der bestimmten Chemokine im Vergleich zwischen Patienten mit Leberzirrhose mit Child-Pugh-Stadium A und C nachgewiesen werden. Eine positive Korrelation

lag zwischen den Konzentrationen von Eotaxin, IL-8, MCP-1 und RANTES - außer zwischen IL-8 und RANTES - vor; bei diesen Chemokinen konnte jedoch keine signifikante Konzentrationserhöhung bei SBP nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  einerseits mit IL-8 im Aszites und andererseits mit MIP-1 $\alpha$  in Serum und Aszites. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Aszites, also einer entzündlichen Infiltration bei Peritonitis, und der Konzentration von MIP-1 $\beta$  im Aszites besteht, sondern auch, dass diese bei Patienten mit SBP und/oder Bakteraszites erhöht ist. Im Rahmen weiterer Studien wurden beim selben Patientenkollektiv weitere Zytokine in Aszites und Serum bestimmt: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Außer der Serumkonzentration von IL-6 waren alle Konzentrationen dieser Zytokine hochsignifikant positiv korreliert mit der Konzentration von MIP-1 $\beta$ . Diese Zytokine sind u.a. bei einem sog. Zytokinsturm erhöht, welcher potentiell lebensbedrohlich ist. Aus diesem Grunde sollten zukünftige klinische Studien und experimentelle Grundlagenforschungen die Rolle sowie Kinetik von MIP-1 $\beta$  im Verlauf abdomineller Entzündungen bei Lebererkrankungen näher untersuchen.



## **I. Abkürzungsverzeichnis**

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHAK-Zellen	CC-Chemokin aktivierte Killerzellen
CRP	C – reaktives Protein
CT	Computertomographie
dl	Deziliter
EASL	European Association for the study of the liver
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
Gro- $\alpha$	growth-regulated oncogene
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C -Virus
HRS	Hepatorenales Syndrom
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon-Gamma Rezeptor
INR	International Normalized Ratio
kDa	Kilodalton
KM	Kontrastmittel
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
m	männlich

M.	Musculus
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MELD	Model for End-stage Liver Disease
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MIP	macrophage inflammatory protein
MRT	Magnetresonanztomographie
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natural-killer cells
OP	Operation
PCT	Procalcitonin
pg	Picogramm
PMN	polymorphonuclear neutrophils
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor
rpm	rounds per minute
SAAG	Serum-Aszites-Albumin-Gradient
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
SEM	standard error of the mean
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor necrosis factor
U	Unit / Einheit
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
w	weiblich
Z.n.	Zustand nach

## II. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Strukturen und Klassifikation der Chemokine. BioLegend GmbH, Zum Grundtal 1, 54341 Fell. [http://www.biolegend.com/chemokine\\_receptors](http://www.biolegend.com/chemokine_receptors). Stand 23.10.2015.
- Abb. 2: Formel zur Berechnung des MELD-Scores
- Abb. 3: Schlottmann-Parazentese-Nadel aus Schlottmann K, Gelbmann C, Grune S et al. A new paracentesis needle for ascites and pleural effusion compared with the venous indwelling catheter; a prospective randomised study. Med Klein 2001; 96; 321 – 324.
- Abb. 4: Prinzip von Multiplex Luminex. DiaMex GmbH, Siemensstr. 38, 69123 Heidelberg. Stand 27.10.2015.
- Abb. 5: Boxplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Subgruppenanalyse von MIP-1 $\beta$  im Aszites
- Abb. 6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und der Granulozytenzahl im Aszites
- Abb. 7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen Eotaxin und IL-8 im Aszites
- Abb. 8: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen Eotaxin und MCP-1 im Aszites
- Abb. 9: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen Eotaxin und RANTES im Aszites
- Abb. 10: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-8 und MCP-1 im Aszites
- Abb. 11: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-8 und MIP-1 $\beta$  im Aszites
- Abb. 12: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MCP-1 und RANTES im Aszites
- Abb. 13: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  im Aszites
- Abb. 14: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  im Serum

- Abb. 15: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  in Aszites und Serum
- Abb. 16: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  in Aszites und Serum
- Abb. 17: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Aszites
- Abb. 18: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Aszites
- Abb. 19: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  im Aszites
- Abb. 20: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1RA im Aszites
- Abb. 21: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-4 im Aszites
- Abb. 22: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-6 im Aszites
- Abb. 23: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-10 im Aszites
- Abb. 24: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-17A im Aszites
- Abb. 25: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Aszites
- Abb. 26: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Serum
- Abb. 27: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Serum
- Abb. 28: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  im Serum
- Abb. 29: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-1RA im Serum
- Abb. 30: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-4 im Serum

- Abb. 31: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-10 im Serum
- Abb. 32: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und IL-17A im Serum
- Abb. 33: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen MIP-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Serum

### **III. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Charakterisierung der Studienkohorte
Tab. 2:	Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg. 1973;60:646-9.
Tab. 3:	Diagnosekriterien zur Klärung der Ätiologie der Leberzirrhose zur Einteilung in die Studiengruppen 1 - 3
Tab. 4:	Übersicht über die Entitäten und Ursacheneinteilung peritonealer Flüssigkeit
Tab. 5:	Charakterisierung der Studienkohorte
Tab. 6:	Korrelation der Chemokine im Aszites
Tab. 7:	Korrelation der Chemokine im Serum
Tab. 8:	Korrelation der Chemokine in Aszites und Serum
Tab. 9:	Korrelation von MIP-1 $\beta$ zu weiteren Zytokinen in Aszites und Serum

#### IV. Literaturverzeichnis

- (1) Navasa M, Rimola A, Rodes J. Bacterial infections in liver disease. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 323-33.
- (2) Berenyi MR, Straus B, Crus D. In vitro and in vivo studies of cellular immunity in alcoholic cirrhosis. *American Journal of Digestive Diseases* 1974; 19: 199-205.
- (3) Thomas HC. The immune response in hepatic cirrhosis: animal and human studies. *Proc R Soc Med* 1977; 70: 521-5.
- (4) Navasa M, Rimola A, Rodes J. Bacterial infections in liver disease. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 323-33.
- (5) Tilg H, Wilmer A, Vogel W et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; 103: 264-74.
- (6) Gerbes AL, Gülberg V, Sauerbruch T et al. S3-Leitlinie „Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom“. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 749-79.
- (7) Arvaniti V, D’Amico G, Fede G et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010; 139: 1246-56.
- (8) Fernandez J, Ruiz del Arbol L, Gomez C et al. Norfloxacin vs ceftriaxone in the prophylaxis of infections in patients with advanced cirrhosis and hemorrhage. *Gastroenterology* 2006; 131: 1049-56.
- (9) Rimola A, Salmeron JM, Clemente G, Rodrigo L, Obrador A et al. Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. *Hepatology* 1995; 21: 674-9.
- (10) Llovet JM, Rodriguez-Iglesias P, Moitinho DE, Planas R, Bataller R et al. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol* 1997; 26: 88-95.
- (11) Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systematic inflammatory response syndrome in cirrhotic patient: relationship with their in-hospital outcome. *J Hepatol* 2009; 51: 475-82.

- (12) Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 26-42.
- (13) Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820.
- (14) Fernandez EJ et al. Structure, function and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; 42: 469-99.
- (15) HayGlass KT, Gangur V, Simons ER. Chemokines – An immunoregulatory role in allergy beyond chemotaxis. *ACI International* 2000; 12/1: 13-19.
- (16) Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-45.
- (17) Wells TNC, Power CA, Shaw JP, Proudfoot AEI. Chemokine blockers – therapeutics in the making? *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 41-7.
- (18) Zlotnik A et al. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. Bd. 12, Nr. 2, 2000, S. 121–127. PMID 10714678.
- (19) Remington JS, Klein JO. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Elsevier 2010, 7<sup>th</sup> Edition.
- (20) Fisher NC, Neil DAH, Williams A, Adams DH. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  in alcoholic liver disease. *Gut* 1999; 45: 416-420.
- (21) Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59: 793-805.
- (22) Jaruga B, Hong F, Sun R, Radaeva S, Gao B. Crucial role of IL-4/STAT6 in T cell-mediated hepatitis; up-regulating eotaxins and IL-5 and recruiting leukocytes. *J. Immunol* 2003; 171: 3233-44.
- (23) Haley KJ, Lilly CM, Yang JH et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000; 102: 2185-9.
- (24) Kitaura M, Nakajima T, Imai T, Harada S, Combadiere C et al. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC



chemokine, and identification of a specific eosinophil receptor, CC chemokine receptor 3. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 7725-30.

- (25) Ogilvie P, Bardi G, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Uguccioni M. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 2001; 97: 1920-4.
- (26) Lampinen M, Carlson M, Hkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59: 793-805.
- (27) Hogan SP, Rothenberg ME. Review article: the eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20: 1231-40.
- (28) Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2005; 38: 1359-65.
- (29) Fernandez-Egea E, Scoriels L, Theegala S, Giro M, Ozanne SE et al. Cannabis use is associated with increased CCL11 plasma levels in young healthy volunteers. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2013; 46: 25-8.
- (30) Daldegan MB, Teixeira MM, Talvani A. Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005; 38: 1359-65.
- (31) Emanuele E, Falcone C, D'Angelo A et al. Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2006; 186: 140-5.
- (32) Tacke R, Trautwein C, Yagmur E, Hellerbrand C, Wiest R, Brenner DA, Schnabl B. Up-regulated eotaxin plasma levels in chronic liver disease patients indicate hepatic inflammation, advanced fibrosis and adverse clinical course. *Gastroenterology* 2007; 22: 1256-1264.
- (33) Jaruga B, Hong F, Sun R, Radaeva S, Gao B. Crucial role of IL-4/STAT6 in T-cell mediated hepatitis: up-regulating eotaxins and IL-5 and recruiting leukocytes. *J. Immunol.* 2003; 171; 3233-44.
- (34) Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, Hagedorn CH, Brenner. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by

a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology* 2003; 37: 653-64.

- (35) Pham BN, Bemua J, Durand F et al. Eotaxin expression and eosinophil infiltrate in the liver of patients with drug-induced liver disease. *J. Hepatol.* 2001; 537-47.
- (36) Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.
- (37) Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000; 72: 391-8.
- (38) Hedges JC, Singer CA, Gerthoffer WT. Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000; 23: 86-94.
- (39) Fain JN, Madan AK, Hiler MI et al. Comparison of the release of the adipokines by adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145: 2273-82.
- (40) Liu P, Li H, Cepeda J et al. Critical role of PBEF expression in pulmonary cell inflammation and permeability. *Cell Biol Intern* 2009; 33: 19-30.
- (41) Middleton J, Neil S, Wintle J et al. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997; 91: 385-95.
- (42) Colmenero J, Bataller R, Sacho-Bru P et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007; 132: 687-89.
- (43) Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1993; 18: 576-80.
- (44) Sheron N, Bird G, Koskinas J et al. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* 1993; 18: 41-6.
- (45) Dominguez M, Miquel R, Colmenero J et al. Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2009; 136: 3049-50.

- (46) Qing-Fang Xiong, Qiong-Hua Yu, Lie-Jun Dai. Examination of ICAM-1 and Chemokines in Serum and Ascites with Liver Cirrhosis Complicated with Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Journal of Xianning College (Medical Sciences)* 2010; 24: 23-26.
- (47) Giron-Gonzalez JA, Rodriguez-Ramos C, Elvira J, Galan F, Del Alamo CF, Diaz F, Martin-Herrera L. Serial analysis of serum and ascitic fluid levels of soluble adhesion molecules and chemokines in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 56-61.
- (48) Haake SK, Huang GTJ. Molecular Biology of the host-Microbe Interaction in Periodontal Diseases (Selected Topics). *Clinical Periodontology* 2002; 9: 162.
- (49) Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 1751-6.
- (50) Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR. Nuclear factor-kappaB-dependant induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 1999; 94: 1878-89.
- (51) Sharabiani MT, Vermeulen R, Scoccianti C, Hosnijeh FS, Minelli L et al. Immunologic profile of excessive body weight. *Biomarkers* 2011; 16: 243-51.
- (52) Brown AS, Hooton J, Schaefer CA, Zhang H, Petkova E et al. Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 889-95.
- (53) Giuntoli RL, Webb TJ, Zoso A, Rogers O, Diaz-Montes TP, Bristow RE, Oelke M. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 2009; 29: 2875-84.
- (54) Shazhad MM, Arevalo JM, Armaiz-Pena GN, Lu C, Stone RL et al. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. *J Biol Chem* 2010; 285: 35462-70.
- (55) Craig MJ, Loberg RD. CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2006; 25: 611-9.

- (56) Simpson KJ, Henderson C, Bone-Larson CL, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles. *Clinical Science* 2003; 104: 47-63.
- (57) Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN- $\alpha$ /beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J. Immunol.* 2005; 174: 1549-56.
- (58) Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *Journal of Immunology* 1992; 148: 2423-8.
- (59) Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3652-6.
- (60) Xia M, Sui Z. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2009; 19: 295-303.
- (61) Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayamam K. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7629-36.
- (62) Foresti ML, Arisi GM, Katki K, Montanez A, Sanchez RM, Shapiro LA. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Journal of Neuroinflammation* 2009; 6: 40.
- (63) Kim J, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of neuroimmunology* 1995; 56: 127-34.
- (64) Hickman SE, El Khoury J. Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 2010; 56: 168-73.
- (65) Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE et al. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1993; 7: 592-600.

- (66) Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): Evidence from severe TBI patients and CCL2<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2009; 30: 769-82.
- (67) Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1885-90.
- (68) Bossink AW, Paemen L, Jansen PM et al. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood* 1995; 86: 3841-7.
- (69) Holub M, Lawrence DA, Andersen N, Davidova A, Beran O, Maresova V et al. *Mediators Inflamm* 2013. Article ID 190145.
- (70) Kim JK, Chon CY, Kim JH, Kim YJ, Cho JH et al. Changes in serum and ascitic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-10 levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 227-30.
- (71) Gäbele E, Mühlbauer M, Hartwig P et al. Analysis of monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5558-62.
- (72) Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 138-46.
- (73) Marsillach J, Bertran N, Campus J et al. The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease. *Clin. Biochem.* 2005; 38: 1138-40.
- (74) Afford SC, Fisher NC, Neil D et al. Distinct patterns of chemokine expression are associated with leucocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998; 186: 82-9.
- (75) Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 1882-6.
- (76) Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatelis G et al. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components,

- macrophage inflammatory protein 1 beta. *J. Exp. Med.* 1988; 168: 2251-9.
- (77) Ren M, Guo Q, Guo L et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.* 2010; 29: 3952-66.
- (78) Stryf S, Menten P, Lenaerts JP, Put W, D'Haese A et al. Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 und 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 2170-8.
- (79) Kobayashi M, Takahashi H, Sanford AP, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F. An increase in the susceptibility of burned patients to infectious complications due to impaired production of macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Immunol* 2002; 169: 4460-6.
- (80) Fisher NC. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1alpha in alcoholic liver disease. *Gut* 1999; 45: 416-20.
- (81) Lesinska M, Hartleb M, Gutkowski K, Nowakowska-Dulawa E. Procalcitonin and macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1 $\beta$ ) in serum and peritoneal fluid of patients with decompensated cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *Advances in Medical Sciences* 2014; 59: 52-6.
- (82) Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. 1988. *J Immunol* 2009; 182: 3947-54.
- (83) Winter H, van den Engel NK, Rusan M, Schupp N, Poehlein CH, Hu HM, Hatz RA, Urba WJ, Jauch KW, Fox BA, Rüttinger D. Active-specific immunotherapy for non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2011; 3: 105-14.
- (84) Song A, Chen YF, Thamatrakoln K, Storm TA, Krensky AM. RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity* 1999; 10: 93-103.
- (85) Song A, Nikolcheva T, Krensky AM. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 2000; 177: 236-45.

- (86) Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 315-9.
- (87) Fischer FR, Luo Y, Luo M, Santambrogio L, Dorf ME. RANTES-induced chemokine cascade in dendritic cells. *J Immunol.* 2001; 167: 1637-43.
- (88) Eissa S, Zaki SA, El-Maghraby SM, Kadry DY. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. *J Egypt Natl Cancer Inst* 2005; 17: 51-55.
- (89) Levy JA. The unexpected pleiotropic activities of RANTES. *J Immunol* 2009; 182; 3945-6.
- (90) Mule JJ, Custer M, Averbook B, Yang JC, Weber JS, Goeddel DV, Rosenberg SA, Schall TJ. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1545-53.
- (91) Kutubuddin M, Federoff HJ, Challita-Eid PM, Halterman M, Day B, Atkinson M, Planelles V, Rosenblatt JD. Eradication of pre-established lymphoma using herpes simplex virus amplicon vectors. *Blood* 1999; 93: 643-54.
- (92) Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T, Haley JL, Ross JL, Longo KL, Murphy WJ, James K, Taub DD. Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumors. *Mol Immunol* 2000; 37: 515-26.
- (93) Lavergne E, Combadiere C, Iga M, Boissonnas A, Bonduelle O, Maho M, Debre P, Combadiere B. Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. *J Immunol* 2004; 173: 3755-62.
- (94) De Andrea M, Gariglio M, Gioia D, Landolfo S, Ravera R. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol* 2002; 6: A41-58.
- (95) Cohen B, Parkin J. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357: 1777-89.
- (96) Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human Genomics* 2010; 5: 30-55.

- (97) Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988; 241: 585-9.
- (98) Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci.* 1996; 59: 61-83.
- (99) Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett.* 2006; 27: 6289-94.
- (100) Zhu J. Review Article: T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* 2015.
- (101) Nakata K, Saitoh R, Amano J et al. Alteration of intracellular secretory acute phase response proteins expressed in human hepatocyte induced by exposure with interleukin-6. *Cytokine* 2012; 59 (2):317-23.
- (102) Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98; 1154-62.
- (103) Mosser D, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008; 226: 205-18.
- (104) Kubly J, Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Kubly immunology*. W.H. Freeman 2007; 396.
- (105) Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361: 888-98.
- (106) Chiricozzi A, Guzman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nogales KE, Tian S et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- $\alpha$  in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2011; 131: 677-8.
- (107) Rahman M, McFadden G. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathog.* 2006; 2: 4.
- (108) Drabek T, Janata A, Wilson C et al. Experimental paper: Minocycline attenuates brain tissue levels of TNF- $\alpha$  produced by neurons after prolonged hypothermic cardiac arrest in rats. *Resuscitation* 2014; 85: 284-91.



- (109) Anand BS. Cirrhosis of liver. WJM, Volume 171, August 1999.
- (110) Remmele W. Pathologie Bd. 2 Verdauungstrakt, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2. Auflage 1996.
- (111) Herold G und Mitarbeiter. Herold Innere Medizin. Ausgabe 2011. K74.6:535.
- (112) Hammerstingl RM, Schwarz WV, Schmitt E, Faust D, Dietrich C, Zeuzem S, Vogl TJ. Bildgebende Diagnostik der Leberzirrhose. Radiologe 2001; 41; 852-867.
- (113) Simonovsky V. The diagnosis of cirrhosis by high resolution ultrasound of the liver surface. Br J Radiol 1999; 72(853): 29-34.
- (114) Denzer UW, Lohse AW. Mini laparoscopy. Dtsch Med Wochenschr 2008; 133(30): 1585-1588.
- (115) Rabe C, Heller J, Sauerbruch T, Caselmann WH. Liver cirrhosis--1: Pathogenesis and diagnosis. Dtsch Med Wochenschr 2001; 126(36):975-977.
- (116) Grüne S, Schölmerich J. Anamnese Untersuchung Diagnose. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007; S. 114f.
- (117) Arroyo V, Gines P, Gerbes AL et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. Hepatology 1996; 23(1):164-176.
- (118) Moreau R, Lebrec D. Review article: hepatorenal syndrome--definitions and diagnosis. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20 Suppl 3:24-28.
- (119) Atterbury CE, Maddrey WC, Conn HO. Neomycin-sorbitol and lactulose in the treatment of acute portal-systemic encephalopathy. A controlled, double-blind clinical trial. Am J Dig Dis 1978; 23(5):398-406.
- (120) Conn HO. Trailmaking and number-connection tests in the assessment of mental state in portal systemic encephalopathy. Am J Dig Dis 1977; 22(6):541-550.
- (121) Atzlesberger M. Hepatische Enzephalopathie "die hepatische Enzephalopathie beginnt wo die geregelte Entgiftungsfunktion der Leber endet". Österreichische Pflegezeitschrift 2005; 05:8-10.
- (122) Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg 1973; 60(8):646-649.

- (123) Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kameth P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R and the United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. The model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91–6.
- (124) Abenhardt W. Supportive Maßnahmen und symptomorientierte Therapie. Fresenius Biotech Clinical Development, 2001.
- (125) Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992; 117(3):215-220.
- (126) Wiest R, Schölmerich J. Aktuelle Diagnostik und Therapie des Aszites. *Der Gastroenterologe* 2008; 3(1):57-67.
- (127) Bruix J, Sherman M, Llovet M, Beaugrand M, Lencioni R et al. Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *Journal of Hepatology* 2001; 35: 421-30.
- (128) Glueck T. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129 Suppl 2:S99-101.
- (129) Wiest R, Schölmerich J. Diagnostik und Therapie des Aszites. *Dtsch Arztebl* 2006; 103(28–29):A 1972–81.
- (130) Dancygier H. Lebererkrankungen - 1x1 der Therapie: Medikamente richtig eingesetzt. Springer Verlag, 2004: 87.
- (131) Wettstein M, Kudlek c, Häussinger D. Spontan bakterielle Peritonitis, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 97(42):2789-2792.
- (132) Press AG, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Z Gastroenterol* 1992; 30(8):543-552.
- (133) Schlottmann K, Gelbmann C, Grune S, Lock G, Schölmerich J. A new paracentesis needle for ascites and pleural effusion compared with the venous indwelling catheter. A prospective, randomized study. *Med Klin (Munich)* 2001; 96(6):321-324.
- (134) MILLIPLEX MAP Kit, Human Cytokine / Chemokine, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA, 2009.

- (135) Gupta V, Zimmermann R et al. Development and Validation of Bio-Plex Pro™ Human Chemokine Assays, Rev A, Protein Technology Research and Development Function Division, Bio-Rad Laboratories Inc, 2000.
- (136) Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. N Engl J Med 2005; 352(18): 1839-42.
- (137) Sun Y, Jin C, Zhan F et al. Host Cytokine Storm Is Associated With Disease Severity Of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome. JID 2012; 206: 1085-94.
- (138) Chensue SW. Molecular machinations: Chemokine signals in host-pathogen interactions. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 821-35.
- (139) Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM et al. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. Eur Cytokine Netw 2003; 14: 172-7.
- (140) Murphy K, Travers P, Walport M. Signaling through immune system receptors. Janeway's Immunobiology 2007, 7th edition. Garland.
- (141) Drazen JM, Cecil RL, Goldman L, Bennet JC. Cecil Textbook of Medicine 2000, 21th edition. W.B. Saunders.

## **V. Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reiner Wiest für die Betreuung der Arbeit und tatkräftige Unterstützung - trotz der mittlerweile örtlichen Distanz - bedanken. Vielen Dank für die Hilfe und Ratschläge.

Besten Dank möchte ich an meine ehemaligen Kommilitonen Theresa Spielmann und Dominik Grabe für die freundschaftliche und konspirative Zusammenarbeit aussprechen – never change a winning team!

Vielen Dank für den moralischen und technischen Support an Johannes Schreier.

Meiner Familie möchte ich ein herzliches Dankeschön aussprechen.

Ich möchte mich im Rahmen der Probenasservierung bei allen involvierten Ärzten insbesondere in Regensburg, aber auch in Bonn und Jena, sowie auf Station und bei den Mitarbeitern des Pflegepersonals und des Casemanagements für die freundliche und ausdauernde Unterstützung bei der Suche nach Studienteilnehmern und deren klinischer Charakterisierung bedanken.

Danke möchte ich für die fachliche Hilfestellung bei der Probenanalytik sowie die Erlernung von Labortechniken und Probenverwaltung vor allem an Frau Szabo sagen.

Ebenso gebührt allen Patienten und Mitwirkenden an der Studie ein ganz besonderer Dank.